

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293026

研究課題名(和文)新規抗多剤耐性菌薬シード開発の多角的戦略

研究課題名(英文) Multifaceted approaches to develop novel antibacterial seeds against drug-resistant bacterial pathogens

研究代表者

市川 聡 (ICHIKAWA, Satoshi)

北海道大学・薬学研究科(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) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：細菌細胞壁合成阻害膜内作用型の天然物であるムライマイシン・カプラザマイシン類の化学構造の大幅な低減と単純化をはかり、MRSAやVRE等の薬剤耐性菌に対する抗菌活性と十分な代謝安定性を持ち、ヒト細胞に対する毒性が軽減した誘導体を見出した。細菌細胞壁合成阻害膜外作用型の天然物であるプラスバシンの効率的で多彩な誘導体合成に柔軟に対応可能な収束型合成法を確立した。2本鎖DNAに結合する事で、強力な転写阻害活性を示すキナルドペプチンの全合成とその誘導体の合成を行った。これらはグラム陽性菌に対してnMレベルの強力な抗菌活性を示し、天然物の活性を上回る活性を有する誘導体を見出す事ができた。

研究成果の概要(英文)：a) Structural simplification of muraymycins and caprazamycins have been investigated to develop analogues possessing antibacterial activity against drug-resistant bacteria such as MRSA and VRE with enough metabolic stability as well as reduced toxicity against human cells. b) Efficient synthetic strategy toward the synthesis of plusbacin A3, which is applicable to the synthesis of a range of analogues, has been developed. c) Total synthesis of quinaldopeptin has been developed via solid-phase synthesis. A range of analogues was synthesized and their antibacterial activity was evaluated to find a potent analogue with superior antibacterial activity than that of natural product.

研究分野：創薬化学

キーワード：天然物 抗菌剤 有機合成

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い、現代の医療における新たな脅威となっている。実際に我が国の医療現場でも、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) による院内感染が問題となっている。既存の薬が全く効かない超薬剤耐性菌も出現しており、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薬剤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る。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)。しかし培養・発酵から豊富に得られ、かつ半合成が可能である場合を除けば、複雑な構造を有する天然物をリードとして創薬研究を進めることは難しい。天然物をリードとする創薬研究を行うには、高効率な合成法の開発と生理活性を保持した構造の単純化が必要となる。このプロセスは function oriented synthesis (FOS, Wender, *et al. Acc. Chem. Res.* 2001, 41, 40) と呼ばれ、これからの創薬研究にますます重要になる。これまで申請者は、科学研究費 (若手 A・B・特定領域研究) の支援の基、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 (カブラザマイシン・ムライマイシン・ムレイドマイシン類) の FOS 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。またその一部は製薬企業との共同研究に進展した

2. 研究の目的

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薬剤を開発することが必要である。複数のターゲットを研究対象として包括的かつ多角的に研究を行い、新規多剤耐性抗菌薬のシードを供給する。個々のターゲットに関しては、従来薬剤にはない新規作用機序を原則とし、これらに作用する生理活性天然物の FOS アプローチにより効率的にシードを獲得する。また、ターゲットの分子機構や天然物の作用機序の詳細を解明することは、薬物設計に関する有用な知見を与える。そのため、

天然物またはその誘導体のプローブを用いてこれらを積極的に解明する。細菌における3つのターゲット (細菌細胞壁合成阻害膜内作用型、同膜外作用型、転写阻害) を研究対象とする。

3. 研究の方法

まずベースとなる天然物の合成法を確立する。さらにムライマイシン・カブラザマイシン類については FOS 研究をすすめ、単純化誘導体を合成する。ジアステレオ選択的な Ugi 多成分反応を用いて、多彩な誘導体合成を見据えたプラスバシン・キナルドペプチンの効率的合成法を開発する。合成した天然物やその誘導体については、各種生物活性評価を指標として FOS 研究へとステージを移行し、いずれの化合物も、抗菌活性・細胞毒性に関する評価を行う。活性が保持した化合物に関しては、活性を向上すべくさらに誘導体を合成し、最終的には、3つのターゲットいずれかからの新規抗菌剤シードの創出を目指す。また同時にプローブ分子を調製し、ターゲットの分子機構や天然物の作用機序の詳細解明を目指したケミカルバイオロジー的アプローチも行う。

4. 研究成果

(1) 細菌細胞壁合成阻害膜内作用型の天然物であるムライマイシン・カブラザマイシン類は分子量が大きく細菌細胞膜透過性に問題を有するとともに、その複雑な化学構造の合成には時間的コストがかかり構造活性相関を行ううえで大きな問題となる。これらの化学構造の大幅な低減と単純化をはかったアミノリボース欠如型であるラクタム縮環イソキサゾリジン骨格を有する化合物を設計した。これらの誘導体は、分子内[3+2]付加環化反応を鍵反応として効率的に合成した。これらの誘導体の抗菌活性を評価したところ、数倍程度の活性の減弱は見られるものの、MRSA や VRE 等の薬剤耐性菌に対して抗菌活性を有する事がわかった。さらにラクタム縮環イソキサゾリジン誘導体のラクタム環サイズの変更や立体異性体を各種合成した。またラクタム環を持たない単環性イソキサゾリジン誘導体も設計・合成した。これらの誘導体も MRSA や VRE 等の薬剤耐性菌に対して抗菌活性を有する事がわかり、ムライマイシン・カブラザマイシン類の分子量と化学構造の大幅な低減と単純化を図ることができた。カブラザマイシン類のジアゼパノン部位は、その構築に多段階の工程を用いる上に化学的に安定ではない 3-アシルオキシカルボニル構造を含む。そこで化学的安定性の増強と合成工程数の削減を目指し、アシル基をアルカンに置換した安定等価体としてカルバカブラザマイシンも設計・合成した。本化合物は、天然物には若干劣るものの、良好な MraY 阻害活性と抗 MRSA・VRE 活性を有す

る事を見出した。また、カルバカブラザマイシン処理した黄色ブドウ球菌は、バンコマイシンとは明らかに異なる細胞形態変化を起こしていることがわかり、従来の抗菌剤とは違うメカニズムを有する事を明らかにした。さらに代謝安定性や細胞毒性の軽減を目指した誘導体として、新規ピペラジン型誘導体を設計し、aza-Prins-Ritter 型の多成分反応を用いる事でその合成法経路を確立した。これらの誘導体は、天然物と同等の *MraY* 阻害活性と抗 MRSA・VRE 活性を有するうえに、ヒト肝がん細胞 HepG2 に対して毒性が低く、バクテリア選択的な抗菌剤リードを見出すに至った。病原性クラミジアに代表される編成細胞寄生体はペプチドグリカンを持たないが、ペプチドグリカンの構成成分であるリピド II を産生するというパラドックスを持つ。ムライマイシン誘導体でクラミジアを処理したところ、細胞分裂の停止と細胞の巨大化が観察された。この結果から、リピド I もしくは II は単にペプチドグリカンの構成成分であるばかりでなく、細胞分裂のシグナル分子であることが示唆された。*MraY* 阻害剤が新たな機序で抗菌活性を示す事が示唆された。

(2) 細菌細胞壁合成阻害膜外作用型の天然物であるプラスバシンの効率的で多彩な誘導体合成に柔軟に対応可能な収束型合成法の確立を達成すべく、2-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* 多成分反応を検討し、これを用いて環化前駆体の合成を行った。この環化前駆体のマクロラクトン化による環化を検討したが、環化反応は全く進行しなかった。そのためマクロラクタム化による合成法へ経路を変更し、プラスバシン A3 の誘導体であるジデオキシプラスバシンの全合成を達成した。本合成法は効率的かつ多彩な誘導体合成に柔軟に対応かのような収束型合成である。合成したジデオキシプラスバシンの抗菌活性を測定したところ、活性が消失することがわかった。CD スペクトルから、ジデオキシプラスバシンは、プラスバシン A3 とは全く異なる高次構造をとることがわかり、プラスバシン A3 が有する二つの水酸基は環状ペプチド骨格のコンフォメーション維持に重要な役割をはたしていることが示唆された。今後の薬物設計に重要な指針を得ることができた。

(3) キナルドペプチンは2本鎖DNAに結合する事で、強力な転写阻害活性とそれに伴う細胞増殖抑制活性を有する。まず固相合成によるキナルドペプチンの全合成を達成した。さらにより効率的で様々な誘導体合成に柔軟に対応しうる合成経路を確立すべく、ジアステレオ選択的な *Ugi* 多成分反応を用いた第2世代合成を開発した。すなわち、*Ugi* 多成分反応により調整したテトラペプチドを[5+5]形式のペプチド縮合とマクロラクタム化を行う事でキナルドペプチンを合成した。本合成法を用いて数種のキナルドペプチン誘導体も合成した。キナルドペプチンとその誘導

体の抗菌活性を検討した結果、グラム陽性菌に対して nM レベルの強力な抗菌活性を示す事がわかった。また、2本鎖 DNA に対する結合能を調べたところ、マイクロ M レベルの結合親和性を有し、配列選択性はあまり無いことがわかった。さらに構造活性相関の検討を継続し、4つの L-ピペコリン酸部を一つでも L-プロリンに置換すると活性が大幅に減弱することがわかった。これらの L-ピペコリン酸部は、2本鎖 DNA 結合時の環状ペプチドのコンフォメーション維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方で、クロモフォア部の変換はある程度許容で、天然物の活性を上回る活性を有する誘導体を見出す事ができた。

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12件)

Nakaya, Takeshi; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi*. **Design, synthesis and biological evaluation of 5'-C-piperidinyl-5'-O-aminoribosyluridines as a potential antibacterial agent.** *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *14*, 7720-7735. 査読有, DOI: 10.1039/c5ob01037c

Chiba, Takuya; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi*. **Structure-activity relationship study of syringolin A as a potential anticancer agent.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4872-4877. 査読有, DOI:10.1016/j.bmcl.2015.06.015

Ichikawa, Satoshi*; Yamaguchi, Mayumi; Hsuan, Lee Shang; Kato, Yuta; Matsuda, Akira. **Carbacaprazamycins: chemically stable analogues of the caprazamycin nucleoside antibiotics.** *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 151-156. 査読有, DOI: 10.1021/id5000376

Yamaguchi, Mayumi; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi*. **Synthesis of isoxazolidine-containing uridine derivatives as caprazamycin analogues.** *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *13*, 1187-1197. 査読有, DOI: 10.1039/c4ob02142h

Takeoka, Yusuke; Tanino, Tetsuya; Sekiguchi, Mitsuaki; Yonezawa, Shuji; Sakagami, Masahiro; Takahashi, Fumiyo; Togame, Hiroko; Tanaka, Yoshikazu; Takemoto, Hiroshi; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda, Akira. **Expansion of antibacterial spectrum of muraymycins toward *Pseudomonas aeruginosa*.** *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 556-560. 査読有, DOI: 10.1039/c4ob02142h

Chiba, Takuya; Hosono, Hidetaka; Nakagawa, Koji; Asaka, Masahiro; Takeda, Hiroshi; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi. * **Total synthesis of syringolin A and its improvement of biological activity.** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *126*, 4936-4939. 査読有, DOI: 10.1002/ange.201402428

Katayama, Katsushi; Okamura, Takuya; Sunadome, Takuya; Nakagawa, Koji; Takeda, Hiroshi; Shiro, Motoo; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi. * **Synthesis and biological evaluation of quinaldopeptin.** *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2580-2590. 査読有, DOI: 10.1021/jo500039d

Tanino, Tetsuya; Yamaguchi, Mayumi; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi. * **Function-oriented synthesis of liponucleoside natural products.** *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 1836-1840. 査読有, DOI: 10.1002/ejoc.201400140

Katayama, Katsushi; Nakagawa, Koji; Takeda, Hiroshi; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi. * **Total synthesis of sandramycin and its analogues via a multi-component assemblage.** *Org. Lett.* **2014**, *16*, 428-431. 査読有, DOI: 10.1021/ol403319m

Ichikawa, Satoshi*; Takuya, Okamura, Matsuda, Akira. **Total synthesis of quinaldopeptin and its analogues.** *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12662-12670. 査読有, DOI: 10.1021/jo402267r

Ichikawa, Satoshi*; Tatebayashi, Nana; Matsuda, Akira. **Synthesis of C-glycosyl pyrrolo[3,4-c]carbazole-1,3(2H,6H)-diones as a scaffold for check point 1 kinase inhibitors.** *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12065-12075. 査読有, DOI: 10.1021/jo4020672

Ichikawa, Satoshi*; Ueno, Hideaki; Sunadome, Takuya; Sato, Kousuke; Matsuda, Akira. **Tris(azidoethyl)amine hydrochloride; a versatile reagent for synthesis of functionalized dumbbell oligodeoxynucleotides.** *Org. Lett.* **2013**, *15*, 694-697. 査読有, DOI: 10.1021/ol400001w

[学会発表](計19件)

Nakaya, T.; Matsuda, A.; Ichikawa, S. **Design and synthesis of simplified caprazamycin analogs**, PACIFICHEM, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Poster Presentation), 15th Dec. 2015, Honolulu, Hawaii (USA) Yamaguchi, M.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. **Design and synthesis of conformationally restricted caprazamycin analogs as antibacterial agents**, PACIFICHEM, The International Chemical Congress of Pacific

Basin Societies 2015 (Poster Presentation), 15th Dec. 2015, Honolulu, Hawaii (USA) Katsuyama, A.; Matsuda, A.; Ichikawa, S. **Synthetic study of plusbacin A₃**, PACIFICHEM, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Poster Presentation), 15th Dec. 2015, Honolulu, Hawaii (USA)

勝山 彬、松田 彰、市川 聡、**Synthetic study of plusbacin A₃**, 第52回ペプチド討論会、口頭発表、2015年11月16日、平塚中央公民館(神奈川県平塚市)

Nakaya, T. Matsuda, A.; Ichikawa, S. **Design, synthesis and biological evaluation of '-C-piperidinyl-5'-aminoribosyluridines as potential antibacterial agents**, The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2015 (Oral Presentation), 23rd Sep. 2015, 姫路市男女共同参画推進センター(兵庫県姫路市)

勝山 彬、松田 彰、市川 聡、**Plusbacin A₃の全合成研究**, 第27回万有札幌シンポジウム(ポスター発表、ベストポスター賞)、2015年7月4日、北海道大学(北海道札幌市)

山口 繭美、松田 彰、市川 聡、**新規抗菌剤開発を指向したリボヌクレオシド系抗菌抗生物質の単純化研究**, 第13回次世代を担う有機化学シンポジウム(口頭発表)、2015年5月22日、立命館大学びわこ・くさつ(BKC)キャンパス(滋賀県草津市)

勝山 彬、松田 彰、市川 聡、**Plusbacin A₃の全合成研究**, 日本薬学会第135年会(口頭発表)、2015年3月28日、神戸学院大学/兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

山口 繭美、松田 彰、市川 聡、**新規抗菌剤開発を指向した isoxazolidinyl uridine 誘導体の設計と合成**, 第32回メディカルケミストリーシンポジウム(ポスター発表)、2014年11月27日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

勝山 彬、松田 彰、市川 聡、**Jollic-Ugi 反応を用いた plusbacin A₃の合成研究**, 第56回天然有機化合物討論会(ポスター発表)、2014年10月16日、高知県立県民文化ホール(高知県高知市)

山田 早、松田 彰、市川 聡、**ラクタム縮環型イソキサゾリジン誘導体の合成**, 第44回複素環化学討論会(ポスター発表)、2014年9月11日、札幌市民ホール(北海道札幌市)

Yamaguchi, M.; Matsuda, A.; Ichikawa, S. **Design and Synthesis of Isoxazolidine-containing Uridine Derivatives as Antibacterial Agents**, ACS 248th National Meeting (Poster Presentation), 14th Aug. 2014, San Francisco (USA).

Nakaya, T.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. **Synthesis of piperidine analogues of caprazamycins by aza-Prins-Ritter reaction**, ACS 248th National Meeting (Poster Presentation), 14th Aug. 2014, San Francisco (USA)

仲谷 岳志、市川 聡、松田 彰、**Scaffold hopping による新規 caprazamycin 誘導体の合成研究**、第 26 回万有札幌シンポジウム (ポスター発表)、2014 年 7 月 2 日、北海道大学 (北海道札幌市)

勝山 彬、松田 彰、市川 聡、**Plusbacin A₃ の合成研究**、日本薬学会北海道支部第 141 例会 (口頭発表、優秀発表賞)、2014 年 5 月 24 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

藤沼 雅巳、松田 彰、市川 聡、**Quinaldopeptin 誘導体の合成研究**、日本薬学会第 134 年会 (口頭発表)、2014 年 3 月 28 日、熊本大学黒髪キャンパス (熊本県熊本市)

勝山 彬、松田 彰、市川 聡、**ジアステレオ選択的な Ugi 三成分反応による 3-ヒドロキシプロリンの合成と plusbacin A₃ の全合成への応用**、日本薬学会第 134 年会 (口頭発表)、2014 年 3 月 28 日、熊本大学黒髪キャンパス (熊本県熊本市)

仲谷 岳志、市川 聡、松田 彰、**aza-Prins 反応を用いた新規カブラザマイシン誘導体の合成研究**、日本薬学会第 134 年会 (口頭発表)、2014 年 3 月 28 日、熊本大学黒髪キャンパス (熊本県熊本市)

中村 公祐、松田 彰、市川 聡、**ムレイドマイシン A 誘導体の合成研究**、第 55 回天然有機化合物討論会 (ポスター発表)、2013 年 9 月 18 日、同志社大学 (京都府京都市)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://japanese-apricot.pharm.hokudai.ac.jp/gousei/iiyaku/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
市川 聡 (ICHIKAWA, Satoshi)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：60333621

(2) 研究分担者
無し

(3) 連携研究者
無し