

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21310136

研究課題名(和文)メカニズム解析に基づく抗菌性化合物の合理的設計

研究課題名(英文)Mode of action study of antibacterial compounds for rational molecular design

研究代表者

有本 博一 (ARIMOTO, HIROKAZU)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60262789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円、(間接経費) 4,110,000円

研究成果の概要(和文)：バンコマイシンは、院内感染症に対する切り札である。しかし、腸球菌の一部がバンコマイシンに耐性を獲得して広がっている(VRE)。米国を中心に、VREのバンコマイシン耐性が黄色ブドウ球菌に伝播を始めており、その対策が急がれる。本研究では、バンコマイシンの化学修飾によって、耐性菌に効力を回復させることを試みた。主な成果は、以下の3点である。1)バンコマイシン耐性菌に特有な細胞壁中間体の化学合成に成功し、in vitroでのペプチドグリカン生合成の追跡を可能とした。2)クロスカップリング反応を用いる新規バンコマイシン修飾法を開発した。3)耐性菌に有効なバンコマイシン二量体の活性配座について知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Vancomycin is a clinically used antibacterial against nosocomial infections. However, vancomycin-resistant enterococci (VRE) is now widespread over the world. Moreover, the resistant nature of VRE has been transferred to *Staphylococcus aureus*, the major nosocomial pathogen. In this study, chemical modifications of vancomycin was conducted to restore its activity to the resistant bacteria. Three major achievements are the following. 1) Cell wall intermediates of vancomycin-resistant bacteria were chemically prepared. It made it possible to examine peptidoglycan biosynthesis in vitro greater in detail. 2) A novel vancomycin modification method using cross-coupling reaction was developed. 3) The active conformation of vancomycin dimers was experimentally suggested.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：抗菌性物質 耐性菌 バンコマイシン

1. 研究開始当初の背景

我が国では 1980 年代にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) による院内感染が多発した。当時は、有効な治療薬が限られていたため大きな問題となった。現在、MRSA に起因する院内感染症治療の切り札はバンコマイシンである。

ところが、バンコマイシンにさえ抵抗する耐性菌 (VRE 1986-, VRSA 2001-) が登場し、拡大している。米国の場合、病院の集中治療室で見つかる腸球菌のうち、VRE の占める割合は 30% 以上とも言われる。隣国の韓国でも高い割合であり、我が国での VRE 拡大は時間の問題と思われた。発病した場合の死亡率は高い。

抗菌薬の場合、ひとつの薬剤は一定の寿命を持っており不断の研究が必要である。この社会的な重要性にも関わらず、採算の面からメガファーマの多くが感染症領域から撤退していた。そのため、相対的にアカデミアの責任は増していた。10 年間に渡る準備研究の結果、私達は VRE に実用的活性を示すバンコマイシン誘導体 (ポリマー、ダイマー、モノマー) を創製していた (報道: C & E News, 1999; Chemical Biology, 2007, 2, B3 他)。

2. 研究の目的

本研究課題では、バンコマイシン耐性の克服に貢献する薬剤リード化合物の創製にむけて研究した。当研究室で見出された誘導体の作用メカニズムを解析し、将来の合理的分子設計を可能とする基盤構築を目指した。

3. 研究の方法

研究項目として (1) 高度化学変換を用いた新規バンコマイシン誘導体の合成, (2) ペプチドグリカン合成反応を担う酵素と薬剤との相互作用解析, (3) 耐性菌に効果を発揮するための活性配座の解析をおいた。

4. 研究成果

(1) 高度化学変換を用いた新規バンコマイシン誘導体の合成 (J. Med. Chem. 2010)

バンコマイシンは複雑に官能基化されており、化学選択的な修飾法が医薬化学研究には欠かせない。バンコマイシンの N 末端, C 末端でのアミド化やバンコサミン部のアルキル化, アシル化など限られた手法を使って徹底的な誘導体合成が行なわれた結果、これ以上の斬新な分子設計は困難となっている。逆に言えば新規選択的修飾法は、全く未開拓の化合物群を与え独創的な医薬化学研究を可能にする。

バンコマイシンの N 末端から第 2 番目と 6 番目のアミノ酸残基には塩化アリール構造が存在するが、この部分での化学修飾は試みられていない。鈴木-宮浦カップリング反応による塩素と炭素置換基の交換が原理的には期待できるが、バンコマイシンが水溶性で

あるため、通常の反応条件は適用できない。そこで、Buchwald によって開発された水溶性ホスフィン配位子とパラジウムを活用して検討を行ったところ、目的の生成物を中程度の収率で得ることができた。第 2 番目のアミノ酸残基の方が反応性が高く、こちらの塩化アリールのみで置換基の導入が可能であった。さらに、反応条件を強くすると 6 番目の残基にも置換基が入り、2 カ所置換体となった。

得られた 13 個の新規化合物について抗菌活性を評価したところ、一部の誘導体にバンコマイシン耐性菌に対する良好な抗菌活性が認められた。

(2) ペプチドグリカン合成反応を担う酵素と薬剤との相互作用解析

Van-M-02 は、当研究室で開発された有望な医薬リード化合物である。バンコサミン部位に 2 つのベンゼン環を含む脂溶性置換基を導入した半合成グリコペプチドであり、その作用機序に興味を持たれる。放射性同位体を用いた実験から、Van-M-02 はバンコマイシン耐性菌のペプチドグリカン合成を阻害することを明らかにした。

続いて、黄色ブドウ球菌細胞膜から調製した粗酵素を用いて、試験管内でペプチドグリカン合成系を再構築し、バンコマイシン感受性、耐性の両モデルの評価を行った。バンコマイシン耐性菌モデルにおいて、Van-M-02 はペプチドグリカン前駆体合成と、その重合の双方を同程度の濃度領域で阻害した。このことは、Van-M-02 が、バンコマイシンとは全く異なる複数の作用機序を介して抗菌活性を発揮することを強く示唆した (Antimicrob. Agents Chem. Ther. 2010)。

バンコサミン部位に脂溶性置換基を持つ誘導体のなかに、ペプチドグリカン重合を担う酵素 PBP との相互作用を持つものが知られているので、次に Van-M-02 と *S. aureus* PBP との相互作用を解析した。上記研究で用いた粗酵素画分と光反応性 Van-M-02 誘導体を混合して標識化したところ、ウェスタンブロット解析において PBP2 との結合が検出された。そこで、精製 PBP2 と光反応性誘導体を用い、プロテオーム的手法で結合サイトを解析した。その結果、Van-M-02 の脂溶性置換基は PBP2 のトランスペプチダーゼドメインに結合していることが明らかとなった。この知見は、合理的薬剤設計の有用な指針と考えている (Med. Chem. Commun. 2012)。

一方、Van-D-06 や 08 は、バンコマイシン 2 分子をリンカーを介して結合した 2 量体分子である。化学構造は異なるものの、1996 年以降、多くの研究グループでバンコマイシン 2 量体が合成され、バンコマイシン耐性菌に対して良好な抗菌活性を示すと報告されている。しかしながら、バンコマイシン 2 量体がバンコマイシン耐性菌に作用する機序

は、実験的に検証されていなかった。本研究では、上記 Van-M-02 の研究にも用いた試験管内ペプチドグリカン合成系を使って、バンコマイシン 2 量体の作用機序解析を行なった。

バンコマイシン 2 量体もまた耐性菌のペプチドグリカン合成を抑制したが、詳細に解析すると Van-M-02 とは異なる点が見られた。すなわち、2 量体はペプチドグリカン前駆体の生合成は抑制しておらず、その重合過程のみを選択的に阻害した。私達は 2 量体が、ペプチドグリカン重合を担う *S. aureus* PBP と直接相互作用し、これが耐性菌に対する抗菌活性発現に関与すると推論した (Med. Chem. Commun. 2011)。

以上の解析の多くは、*S. aureus* 細胞壁合成酵素を粗酵素のまま用いた。ペプチドグリカン重合の過程は、*S. aureus* の場合、PBP2 によって触媒されている。精製した PBP2 とその酵素基質を用意できれば、単一の酵素反応としてより詳細な解析が可能となる。そこで、バンコマイシン耐性菌の前駆体である depsi-lipid I と II の調製を行なった。全合成的手法で調製し、これが PBP2 によってペプチドグリカンに変換されることを確認した。今後は、この系を用いて速度論解析を行ない、バンコマイシン誘導体の作用機序をより詳細に解析する予定である (Chem. Eur. J. 2013)

(3) 耐性菌に効果を発揮するための活性配座の解析

2 量体が耐性菌に効果を示す際には、2 つのバンコマイシンユニットが協奏的に標的と結合すると予想される。しかしながら、2 量体は配座自由度が大きいいため、どの部分構造が直接抗菌活性に関わっているのか解明されていなかった。

そこで、2 本のリンカーを使って (環状構造とし) 配座を制限した 2 量体を合成した。抗菌活性を評価したところ、従来 Back-to-back と呼ばれている配座が、耐性菌に対する活性に重要と示唆された。この配座においては、バンコマイシン N 末端に存在するロイシン残基と、もう一分子のバンコマイシンユニットの C 末端が同時に同じ方向を向く。このため、これらの部分構造をもとにした更なる研究を推進中である (Chem. Eur. J. 2012)。

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 6 件)

Nakamura, J.; Yamashiro, H.; Miya, H.; Nishiguchi, K.; Maki, H.; Arimoto, H. "Staphylococcus aureus Penicillin-Binding Protein 2 Can Use Depsi-Lipid II Derived from

Vancomycin-Resistant Strains for Cell Wall Synthesis" Chemistry - A European Journal 19. 12104-12112. (2013), DOI: 10.1002/chem.201301074, 査読有

Nakamura, J.; Ichikawa, R.; Yamashiro, H.; Takasawa, T.; Wang, X.; Kawai, Y.; Xu, S.; Maki, H.; Arimoto, H.: "Mapping of a Lipoglycopeptide Antibiotic Binding Site on Staphylococcus aureus Penicillin-Binding Protein 2 Using a Vancomycin Photoaffinity Analogue" Medicinal Chemistry Communications 3. 691-695. (2012), DOI: 10.1039/C2MD20005H, 査読有

Nakamura, J.; Yamashiro, H.; Hayashi, S.; Yamamoto, M.; Miura, K.; Xu, S.; Doi, T.; Maki, H.; Yoshida, O.; Arimoto, H.: "Elucidation of the active conformation of vancomycin dimers with antibacterial activity against vancomycin-resistant bacteria" Chemistry - A European Journal 18. 12681-12689 (2012), DOI: 10.1002/chem.201201211, 査読有

Yoshida, O.; Nakamura, J.; Yamashiro, H.; Miura, K.; Hayashi, S.; Umetsu, K.; Xu, S.; Maki, H.; Arimoto, H.: "New Insight into the Mode of Action of Vancomycin dimers in Bacterial Cell Wall Synthesis" Medicinal Chemistry Communications 2. 278-282 (2011), DOI: 10.1039/COMD00230E, 査読有

Miura, K.; Yamashiro, H.; Uotani, K.; Kojima, S.; Yutsudo, T.; Lu, J.; Yoshida, O.; Yamano, Y.; Maki, H.; Arimoto, H.: "Mode of Action of Van-M-02, a Novel Glycopeptide Inhibitor of Peptidoglycan Synthesis, in Vancomycin-resistant Bacteria" Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54. 960-962 (2010), DOI: 10.1128/AAC.00927-09, 査読有

Nakama, Y.; Yoshida, O.; Yoda, M.; Araki, K.; Sawada, Y.; Nakamura, J.; Xu, S.; Miura, K.; Maki, H.; Arimoto, H.: "Discovery of a novel series of semi-synthetic vancomycin derivatives effective against vancomycin-resistant bacteria" Journal of Medicinal Chemistry 53. 2528-2533 (2010), DOI: 10.1021/jm9017543, 査読有

[学会発表](計 9 件)

有本博一: "感染症の制御に向けた化学からのアプローチ" 中西シンポジウム 2012. (20120325). 慶応義塾大学(横浜市)

有本博一: "感染症の理解と制御のための

化学的アプローチ" 日本化学会会員増強のための講演会. (20111125). 東北大学理学部(仙台市)

有本博一: "Chemical Approaches for Understanding and Controlling Infectious Diseases" The Uehara Memorial Foundation Symposium-2011 : Chembiomolecular Science : at the Frontier of Chemistry and Biology. (20110608). Hyatt Regency Tokyo(東京都新宿区)

有本博一: "感染症の理解と制御のための化学的アプローチ" 第13回生命化学研究会. (20110108). 仙台市ホテル佐勘"

有本博一: "感染症の理解と制御のための化学的アプローチ" 神奈川大学工学部学術フロンティアプロジェクト公開シンポジウム. (20101002). 横浜市神奈川大学横浜キャンパス

有本博一: "感染症の理解と制御のための化学的アプローチ" 第22回万有札幌シンポジウム. (20100703). 札幌市さっぽろ芸術文化の館

有本博一: "バンコマイシン耐性の理解と制御を目指した化学的アプローチ" 日本薬学会 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. (20091130). 大阪大学コンベンションホール(大阪府吹田市)

有本博一: "感染症の理解と制御のための化学的アプローチ" 第8回化学系薬学若手研究者セミナー. (20091003). 東北薬科大学(宮城県仙台市)

有本博一: "産学連携による新規抗菌薬の探索" 第57回日本化学療法学会総会. (20090604). ホテル日航東京(東京都)

[図書] (計1件)

有本博一(分担執筆), 有機合成化学協会編: "天然物合成で活躍した反応: 実験のコツとポイント" 化学同人. 224-225 (2011)

[産業財産権]

取得状況(計 1件)

名称: グリコペプチド抗生物質ダイマー誘導体

発明者: 有本博一, 路軍, 山野佳則, 吉田修
権利者: 塩野義製薬株式会社、国立大学法人名古屋大学

種類: 特許

番号: 4888863

取得年月日: 平成23年12月22日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bunseki/ArimotoGroup.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有本 博一 (ARIMOTO HIROKAZU)

東北大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号: 60262789