

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510311

研究課題名(和文) 安定ホスホヒスチジン模倣化合物を基盤とした新規抗生物質の創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery research: Searching for a new antibiotics based on stable phospho-histidine mimics

研究代表者

山口 泰史 (Yamaguchi, Yasuchika)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：10183980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、ヒトにはない、バクテリア特有の情報伝達システムである二成分制御系を標的として、新規抗生物質創製を目指した。ホスホヒスチジンの模倣化合物を組み込んだライブラリーから、抗菌活性をもつ化合物をさがした。

現在までの実績をまとめる。Schoelkopf試薬を用いる立体選択的なアミノ酸誘導体合成法を確立した。必要量のホスホヒスチジン模倣化合物を合成した。模倣化合物を含むペプチド合成法を確立した。リン酸部分の脱保護反応の条件を確立した。汎用性の高いジペプチド様化合物の合成法を確立した。プロドラッグ化したリン酸残基をもつ化合物の合成に成功した。現在、活性化合物を検索中である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was searching for potential new antibiotics targeting bacterial two-component signal transduction system. Our achievements, so far are following: 1) We established stereoselective and scalable amino acid synthesis based on Schoelkopf chemistry. 2) We prepared enough quantity of the phospho-histidine mimic. 3) Synthetic method for peptides containing the mimic is established. 4) Deprotection protocol for generating free phosphoric acid is invented. 5) Rapid and cheap synthesis method for dipeptide mimics is developed. Biological assay for antibiotic activities are still on going.

研究分野：医薬品化学

キーワード：ホスホヒスチジン ペプチドライブラリー 抗菌活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 感染症と多剤耐性菌の問題:

多剤耐性を示す病原微生物の蔓延は、大きな社会問題である。MRSA 広がりやバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の出現(1988)は、問題の深刻さを表している。昨年(2010)、カルバペナムにも耐性を示す New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1)をもつ腸内細菌が単離され(Lancet Infect. Dis. 2010)、わが国でもその感染が確認された。この状況下、新しい作用機序を有する新規抗生物質の発見と臨床開発が急務である。

(2) 抗生物質の創薬プロセス、ゲノムの利用とその問題点

従来、抗生物質探索は、微生物由来の天然物、または既知の抗生物質誘導体を用い、抗菌活性(whole cell screening)を指標として行われてきた。

一方、近年、バクテリアゲノムの利用に大きな期待が集まった。Glaxo-SmithKline社は、1995~2001年に300以上の遺伝子を精査し、うち160の遺伝子が「Essential」であることを明らかにした。しかし、これらを標的としたin vitroランダムスクリーニングから、ほとんどリード化合物は見つからなかった。(Nature Rev. Drug Discov. 2007)ゲノム利用の抗生物質探索には、二つの問題点が存在する。評価系の問題:単離した酵素などを用いるin vitro評価系で活性を見出しても、抗菌活性がない場合が多い。ライブラリーの問題:ライブラリーに入っている他の領域の医薬品候補の分子特性と大きく異なり、抗生物質の場合、「比較的分子量が大きく」、また「より高い極性」が必要となる。(Stephenson, 筆者 & Hoch, JBC. 2000)本研究では、これら二つの問題点に照準をあわせる。

2. 研究の目的

本研究課題は、ヒトにはない、バクテリア特有の情報伝達システムである二成分制御系を標的として、新規抗生物質創製を目指す。ホスホヒスチジンの模倣化合物を組み込んだライブラリーから、抗菌活性を見つけ出す。具体的には、不安定なP-N結合を安定なP-C結合に置き換えたヘテロ環をもつアミノ酸を模倣化合物として合成する。それをコア構造に、ライブラリーを基質様阻害剤として構築する。単離した酵素を用いるin vitro評価系ではなく、簡便なディスク法による抗菌活性評価(whole-cell screening)を一次アッセイとして、リード化合物の検索を行う。

3. 研究の方法

本課題は、以下に示す工程で研究を進めていく。

(1) P-N結合を安定なP-C結合に置き換えたホスホヒスチジン模倣化合物の設計と

合成

(2) ホスホヒスチジン模倣化合物を含むペプチドライブラリーの構築

(3) 合成ペプチドの抗菌活性評価

(4) 活性評価に基づく二次ライブラリーの構築と評価

ヒトにはない、バクテリア特有の情報伝達システムである二成分制御系を標的として、新規抗生物質創製を目指す。ホスホヒスチジンの模倣化合物を組み込んだライブラリーから、抗菌活性を見つけ出す。

4. 研究成果

(1) Schoellkopf 試薬を用いる立体選択的なアミノ酸誘導体合成ルートにより、目的とするホスホヒスチジン模倣化合物(数種)の合成法を確立した。ホスホン酸の保護基を選択的に脱保護する反応条件も併せて確立した。さらにホスホヒスチジン模倣化合物合成のスケールアップにも成功し、ライブラリー構築のための必要量を確保した。

(2) 模倣化合物を含むペプチド合成法を確立した。特に、ペプチド化ののち、ホスホン酸の保護基を選択的に脱保護する反応条件も見つけた。

(3) 模倣化合物を含むジペプチドライブラリーおよびトリペプチドライブラリーを構築した。

(4) 今のところ、目的とする強い抗菌活性を示す化合物の発見には至らなかった。しかし、実験を通して、本アプローチにおける問題点も明らかになった。今後、それらを解決する化合物群(ライブラリー)を作成し、強い抗菌活性を示す化合物の発見を目指す。

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 9件)

Masayori Hagimori, Takuhiro Uto, Naoko Mizuyama, Takashi Temma, Yasuchika Yamaguchi, Yoshinori Tominaga, Hideo Saji. Fluorescence ON/OFF Switching Zn²⁺ Sensor Based on Pyridine-Pyridone Scaffold, Sensors & Actuators, B: Chemical(2013), 181, 823-828. 査読有。DOI:10.1016/j.snb.2013.02.033

山口 泰史、体験から考える創薬化学: Es war einmal./Once upon a time. MEDCHEM NEWS (2013), 23(2), 6-10. 査読無。

http://medchem.pod.ne.jp/index.php?option=com_content&view=article&id=100%3Amedchem-news-&catid=36%3Acategory3&Itemid=56&lang=ja

Nguyen Huu Tung et al. Yasuchika Yamaguchi (15 人中 11 番目), Anti-Trypanosomal Activity of Diarylheptanoids Isolated from the Bark of *Alnus japonica*. Am. J. Chin. Med., (2014), 42(5), 1245-1260. 査読有.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1142/S0192415X14500785>

山口 泰史、体験から考える創薬化学 2 : Es war einmal./Once upon a time. MEDCHEM NEWS (2014), 24(4), 8-11. 査読無.

http://medchem.pod.ne.jp/index.php?option=com_content&view=article&id=118%3Amedchem-news-&catid=36%3Acategory3&Itemid=56&lang=ja

Masayori Hagimori, Takashi Temma, Naoko Mizuyama, Takuhiro Uto, Yasuchika Yamaguchi, Yoshinori Tominaga, Takahiro Mukai, Hideo Saji. A high-affinity fluorescent Zn²⁺ sensor improved by the suppression of pyridine-pyridone tautomerism and its application in living cells. Sensors and Actuators B: Chemical, (2015) Volume 213, 5, 45-52. 査読有.

DOI:10.1016/j.snb.2015.02.063

Mitsuko Suzuki et al. Yasuchika Yamaguchi (27 人中 21 番目), New anti-trypanosomal active tetracyclic iridoid isolated from *Morinda lucida* Benth., Bioorg Med Chem Lett., 25(15), 3030-3033, (2015), 査読有.

DOI:10.1016/j.bmcl.2015.05.003

藤田 英明、檜崎 彩香、大久保 麻佳、藤井 佑樹、藤原 俊幸、萩森 政頼、山口 泰史。亜鉛イオン応答性ピリジン-ピリドン型蛍光プローブを用いた細胞内亜鉛分布解析への挑戦(その1) Challenges to Detect an Intracellular Localization of Zinc Ion by Zn²⁺ Responsive Fluorescent Probe, a Pyridine-Pyridone Derivative (Part 1). 長崎国際大学論叢、第 15 巻、185 - 192, (2015), 査読有.

https://niu.repo.nii.ac.jp/?action=page_s_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=925&item_no=1&page_id=13&block_id=17

Satoru Karasawa et al. Yasuchika Yamaguchi (29 人中 24 番目), Determination of the absolute configuration of the novel anti-trypanosomal iridoid molucidin isolated from *Morinda lucida* by X-ray analysis. Tetrahedron Letters, 56 (52), 7158-7160. 査読有.

DOI:10.1016/j.tetlet.2015.11.031

Kofi D. Kwofie et al. Yasuchika Yamaguchi (27 人中 20 番目), Antitrypanosomal Activities and Mechanisms of Action of Novel Tetracyclic Iridoids from *Morinda lucida* Benth. Antimicrob. Agents Chemother. 2016, 60(6) 3283-3290. 査読有.

<http://aac.asm.org/content/60/6/3283.short17>

[学会発表](計 17 件)

Masayori HAGIMORI*, Naoko MIZUYAMA, Takahiro MUKAI, Yasuchika YAMAGUCHI, Yoshinori TOMINAGA, and Hideo SAJI. (*発表者), Zn²⁺ Selective Fluorescent Probe Based on the Bipyridine Scaffold for Biological Applications. 第 22 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2012) (金沢) 2012.05.31-06.01.

濱崎 翔平*、萩森 政頼、田中 啓太郎、山口 泰史(*発表者)、ルイス酸フリーの Friedel-Crafts アシル化反応の開発、第 9 回化学関連支部合同九州大会 (小倉) 2012.06.30.

萩森 政頼*、水山 奈央子、天満 敬、向 高弘、山口 泰史、富永 義則、佐治 英朗 (*発表者)、亜鉛イオンに対して高親和性を有する低分子量蛍光プローブの開発、第 10 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (京都), 2012.08.06-07

山口 泰史、降圧薬プロジェクトから考える創薬研究、SYMPOSIUM2013 公開記念シンポジウム 創薬研究の潮流、福岡市、招待講演、2013.02.02.

田中 啓太郎*、萩森 政頼、山口 泰史(*発表者)、日本薬学会第 133 回年会 (横浜) (30pmA-793) 2013.03.27-0330.

Keitaro Tanaka*, Masayori Hagimori, Yasuchika Yamaguchi.(*発表者), Activation of acyl group with sodium iodide. The 23rd French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry (Nagasaki), 2013.05.12-15.

萩森 政頼*、水山 奈央子、向 高弘、山口 泰史、富永 義則、佐治 英朗 (*発表者)、生体内亜鉛イオンのイメージングを目的とした低分子量蛍光プローブの開発、第 24 回日本微量元素学会学術集会 (吹田市)、2013.06.29-30.

田中 啓太郎*、田中 誠一、萩森 政頼、

山口 泰史(*発表者)、NaI を用いたアシル化剤活性化の検討、第 30 回日本薬学会九州支部大会(佐世保市)、2013.12.07-08.

大久保 麻佳、檜崎 彩香、萩森 政頼、山口 泰史、藤井 佑樹、藤原 俊幸、徳永 研三、藤田 英明(*発表者)、亜鉛輸送体 ZIP14 の細胞内輸送および機能発現制御に関する基礎的解析、第 30 回日本薬学会九州支部大会(佐世保市)、2013.12.07-08.

山口 泰史、体験から考える創薬化学：Es war einmal in Basel, La Jolla und Connecticut. アステラス製薬株式会社 つくば研究センター講演会(つくば市)招待講演、2013.12.18.

田中 啓太郎*、田中 誠一、山口 泰史(*発表者)、分子内アシル転位反応を利用したペプチド合成、日本薬学会第 134 回年会(熊本)、2014.03.28-30.

Masayori Hagimori*, Naoko Mizuyama, Yasuchika Yamaguchi, Hideo Saji, Takahiro Mukai(*発表者)、High affinity fluorescent probe for Zn²⁺ based on bipyridine scaffold. The World Molecular Imaging Congress (WMIC) Seoul, 2014.09.17-20.

山口 泰史、プロジェクトから考える創薬研究：Es war einmal in Basel, La Jolla und Connecticut. 有機化学研究会(白鷺セミナー)大阪府立大学 招待講演、2014.12.05.

田中 啓太郎*、田中 誠一、梶原 宏恵、加茂 章弘、東 叶奈、山口 泰史(*発表者)、アミノアルコールを含むジペプチドの合成、第 31 回日本薬学会九州支部大会(福岡市)、2014.12.06-07.

田中 啓太郎*、田中 誠一、山口 泰史(*発表者)、NaI によるアシル化剤活性化機構を利用した反応開発、日本薬学会第 135 回年会(神戸)、2015.03.25-28.

山口 泰史、失敗と困難から学ぶ創薬研究：Once upon a time in Switzerland and America. 日産化学株式会社 物質科学研究所 創薬セミナー(船橋市)招待講演、2015.06.18.

田中 啓太郎*、田上 兼輔、今村 和也、小田 綾子、橋本 峻志、松尾 綾香、山口 泰史(*発表者)、分子内アシル化反応によるペプチド合成法の開発、日本薬学会第 136 回年会(横浜)、2016.03.26-29.

〔図書〕(計 1 件)

山口 泰史他、廣川書店、新有機医薬品合成

化学、2013、355 (85-116)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 泰史(YAMAGUCHI, Yasuchika)
長崎国際大学・薬学部・教授
研究者番号：10183980

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

田中 啓太郎(TANAKA, Keitaro)
研究者番号：60446127
長崎国際大学・薬学部・講師

萩森 政頼(HAGIMORI, Masayori)
研究者番号：40446125
長崎大学・薬学部・准教授

(4) 研究協力者

木野 亨(KINO, Toru)