

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07708

研究課題名(和文)作用機構変化を意図した天然物クラスター化による新規抗菌剤開発研究

研究課題名(英文) Drug discovery research for a novel antibiotic compound through clusterization of natural products

研究代表者

榎本 賢 (Masaru, Enomoto)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90546342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生物活性物質の中には、多量化により作用機構が変化することで活性が強化される「作用機構変化型」ともいふべきクラスター効果を示す化合物も存在する。イオノフォア天然物monensin (Mon)は八量化するとプロトンチャンネルに作用機構が変化することが計算化学により示唆されている。本研究では、Monを多量体化することでより強力な細胞毒性を示すプロトンチャンネルを創製することを最終的な目標とした。論文に記載されているデータを再精査したところ、Mon八量体は、二量体を基本構成単位としてそれが4つ連なったものであることに気づき、実際にこれを合成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤(多剤)耐性菌への対処は人類にとって喫緊の課題となっている。その一方で、新たに開発される(発見される)薬剤の種類は頭打ちの傾向にあり、新たな創薬方法論の開発が期待される。これまでは化学構造の変換による方法がもっぱら実施されていたが、物理的な効果により既存の天然物の活性強度を簡便に強化できれば、無名の低活性天然物が強力な抗菌剤へと生まれ変わる可能性がある。これにより、薬剤候補化合物数の増加に貢献できるとともに、既存の化学構造改変法と異なる新たな創薬方法論を提示できる。

研究成果の概要(英文)：Monensin (Mon) is an ionophore natural product exhibiting potent cytotoxic activity. Meanwhile, computational analysis anticipated that its methyl ester (MME) might act as an ion channel when MMEs aggregate to be an octamer. This result would suggest that clusterization of bioactive compounds might change their mechanism of activity, by which the intensity of activity of some bioactive natural products could also be improved compared to the original compounds. Thus, we embarked on the synthetic study of a monensin octamer to prove the anticipation. If this methodology could be applied to various bioactive compounds, this can lead to a novel concept for drug discovery research.

研究分野：天然物化学, 有機合成化学

キーワード：クラスター効果 monensin イオンチャンネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤(多剤)耐性菌の出現に伴い、有効な抗菌剤の開発が強く求められている。近年の抗菌剤の開発は合成化合物ライブラリーからのスクリーニングを主な手段としていたが、それらの構造多様性には限界があるため(*Nature* **2004**, 432, 824),新たな薬理活性が見出される化合物も頭打ちになってきた。この問題を解決するために構造多様性に優れた天然物の利用が見直されている。従来の天然物由来の抗菌物質開発研究では、活性強化の手段を構造の改変に大きく依存してきた。しかし、天然物の多くはその活性が複雑な構造に起因しているため、標的部位に対する結合力の増強を意図して構造改変を行うと活性が失われてしまうことが多い。従って、これまでとは全く異なるアプローチによる創薬方法論の開発が望まれている。

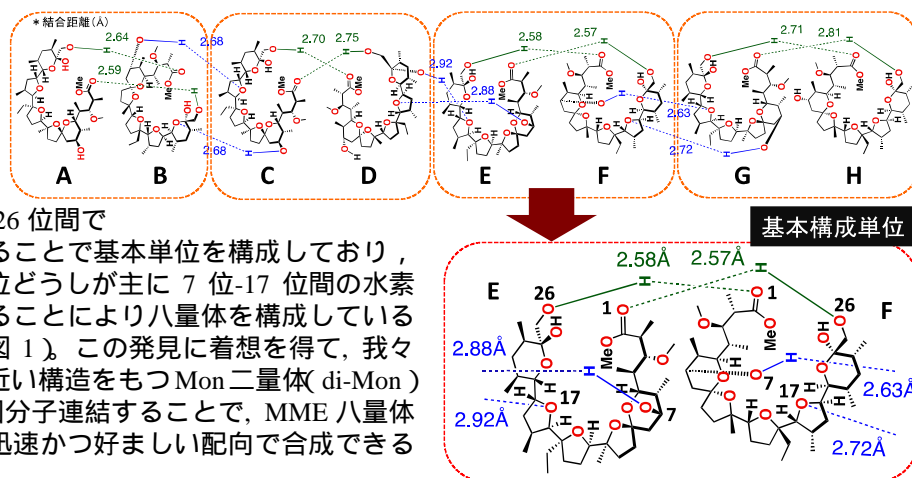
2. 研究の目的

申請者は、本研究の開始に先立ち、抗 HIV 活性天然物 pradimicin (PRM) の糖鎖への結合活性が分子のクラスター化(多量化)により向上することを明らかにした(*Tetrahedron*, **2015**, 71, 2603)。この効果は、「結合力強化型」のクラスター効果と位置付けられる。この効果は、これまでに糖鎖やペプチドの結合力、ひいては生物活性強化を目的に利用されてきた。(有機合成化学協会誌, **2015**, 73, 388)一方、天然物の中には、分子のクラスター化により作用機構が変わる、「作用機構変化型」のクラスター効果が期待できるものがある。これらは、その存在が示唆されているものの(*Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 757),人工的に実現した例は皆無のようであった。申請者の考察では、この効果はポリエーテル構造を有する天然物において実現可能であると考えられた。実際に、イオノフォア活性を示すポリエーテル天然物 Monesin (Mon) は、そのメチルエステル体(MME)を八量化すると作用機構が変化し、イオンチャンネルとして作用することが計算化学的に予想されていた(*J. Phys. Chem.* **2006**, 110, 15615)。そこで本研究では、Mon をプラットフォームにして作用機構変化型クラスター効果の実現を目指して研究を実施した。

3. 研究の方法

我々は、先ず上述の論文(*J. Phys. Chem.* **2006**, 110, 15615)のデータを精査した。すると、MMEの八量体は、二分子のMMEが1位-26位間で互いに水素結合することで基本単位を構成しており、さらにこの基本単位どうしが主に7位-17位間の水素結合で四分子連なることにより八量体を構成していることに気づいた(図1)。この発見に着想を得て、我々は基本構成単位に近い構造をもつMon二量体(di-Mon)を調製し、これを四分子連結することで、MME八量体に相当する構造を迅速かつ好ましい配向で合成できると考えた。

図1 MME八量体の構造と基本構成単位



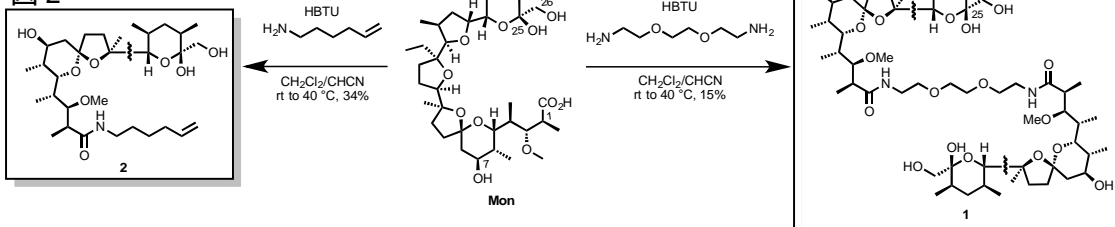
4. 研究成果

(1) peg-di-Mon の合成と生物活性

もっとも単純な Mon の二量体として、triethylenelinker を有する Mon 二量体 (1) の合成と生物活性の評価を行った。また、amide を有する Mon 誘導体 (2) についても合成と生物活性の評価を行った。合成方法を図2に示す。

合成した化合物を連携研究者此木のもとで細胞毒性試験に供したところ、1と2は細胞毒性が共に Mon の約 1/100 であるという結果が示された(図3)。またアミド2と二量体1の活性に大きな差がなかった。イオン輸送試験ではなく細胞毒性試験の結果ではあるものの、1位のカルボキシ基で二量体した化合物は二量化の恩恵を受けておらず、ナトリウムイオンの取り込み能が向上していないことが示唆された。今後は二量化の修飾位置を中心に、リンカーの種類・長さも含めて、さらなる検討を行う予定である。

図2



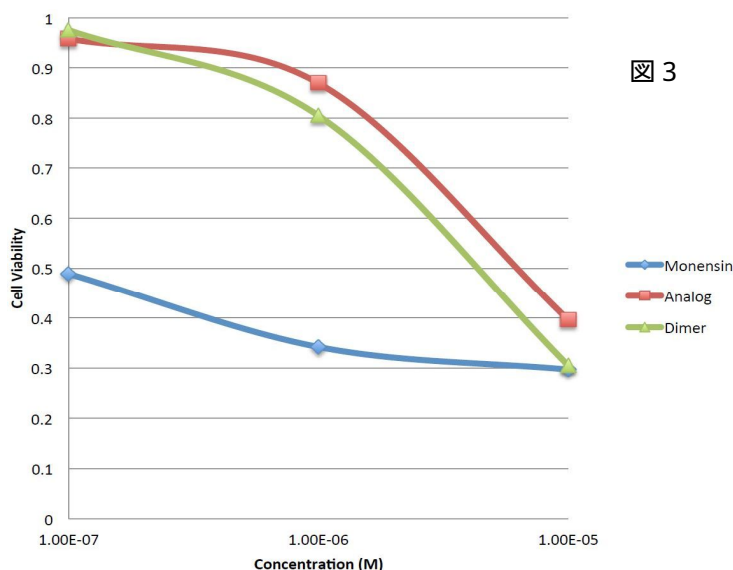
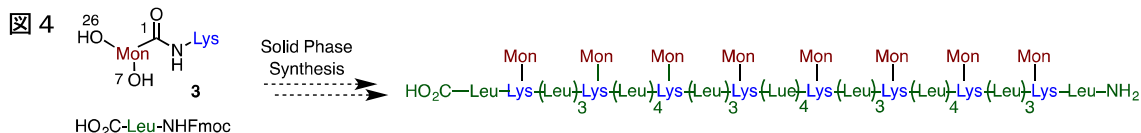


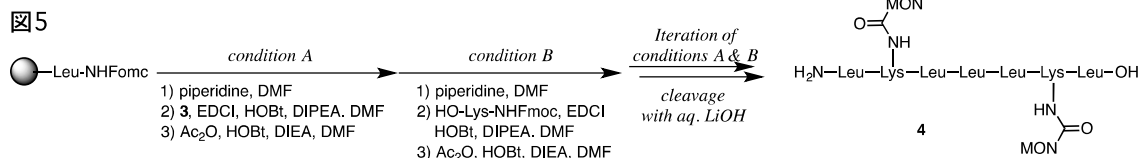
図 3

(2) ペプチドバックボーンをもつ Mon 二量体の合成

合成化学的に Mon を直線的に四分子連結する合成経路の場合、最終的に得られる八量体が望む配座（高次構造）をとるかは不透明であった。そこで、直線的な α -ヘリックス構造をとる leucine リッチなペプチドを「支柱」とし、その「支柱」に並ぶように Mon を配置する戦略を立案した。即ち、Mon の 1 位カルボキシ基と lysine 残基側鎖アミノ基の間で縮合した **3** を調製した後に、ペプチド合成法を利用してこれと leucine を連結することにより目的とする八量体を迅速に合成する（図 4）。 α -ヘリックス構造をもつペプチドは 3.6 残基で 1 回転して、そのピッチは約 5.5 オングストロームとされている。一方 Bruzenski らの計算によると (*J. Phys. Chem.* 2006, 110, 15615), MME 八量体の全長はおよそ 60 オングストロームであることから、基本構成単位の高さは約 7 オングストロームと算出される。従って、Mon がペプチドの支柱に 3.5 残基毎に現れるように連結すれば、イオンチャネルの形成に適切な間隔を置いて di-Mon 構造を直線状に配置できると考察した。ペプチドを支柱とするイオンチャネル合成戦略はクラウンエーテルを利用したイオンチャネル創生研究でも採用されていることから (*Angew. Chem. Int. Ed.* 1997, 36, 967), 本戦略は合理的と考えられる。

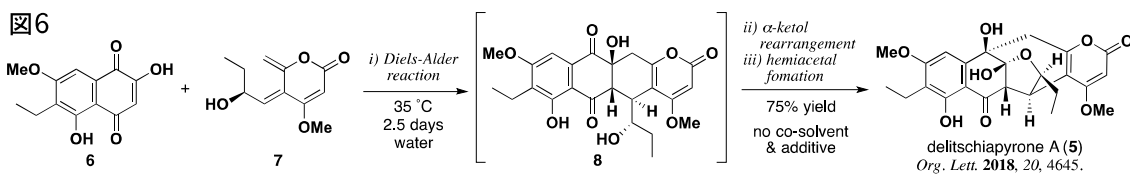


まずは、実際に Mon を結合させた leucine リッチなペプチドが α -ヘリックス構造をとるかどうかを確認するために、基本構成単位にあたる di-Mon 構造を含む化合物の合成を行った。実際の合成スキームを図 5 に示す。FmocLeu を担持した Wang レジンを使用し、一般的な固相合成の手法に従ってアミノ酸を伸長し、MS 解析により **4** と思われる化合物を得た。現在、**4** の精製と α -ヘリックス構造の確認を行っている。



(3) クラスター効果が期待される天然物の全合成研究

上記の Mon に関する研究以外に、多量化によりクラスター効果が期待される天然物の全合成研究にも取り組み、bacilosarcin B 及び C, aurachin B 及び H, delitschiapyrone A 等の生物活性天然物の全合成に成功した。Delitschiapyrone A (**5**) は、落葉に生息する真菌から単離された細胞毒性物質で、前例の無い極めて複雑な 6/6/5/7/6 五環性骨格を特徴とする。申請者は、予想合成中間体 **6** と **7** を調製し、これらを水とともに 35 °C で 2 日間撹拌したところ、驚くべきことに Diels-Alder 反応、 α -ケトール転位及びヘミアセタール形成の 3 反応が一挙に進行し、**5** が高収率で得られることを見出した。これにより、市販化合物から **7** 工程（総収率 32%）で **5** の全合成を達成した（図 6）。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- (1) 五十嵐 康弘, 齋藤 克哉, 榎本 賢, 桑原 重文, 春成 円十郎, 奥 直也 他 (計 15 名, 7 番目), Ktedonoketone and 2'-oxosattabacin, benzenoid metabolites from a thermophilic bacterium *Thermosporothrix hazakensis* in the phylum *Chloroflex*, *Journal of Antibiotics* (査読有), **2019**, DOI: org/10.1038/s41429-019-0195-7; URL: https://www.nature.com/articles/s41429-019-0195-7
- (2) 目黒 康洋, 小倉 由資, 榎本 賢, 桑原 重文, Synthesis of the N-Acyl Amycolose Moiety of Amycolamicin and Its Methyl Glycosides, *The Journal of Organic Chemistry* (査読有), **2019**, DOI: org/10.1021/acs.joc.9b00650.
- (3) 菅原 亜寿美, 吉見 啓, 榎本 賢, 桑原 重文, 阿部 敬悦 他 (計 15 名, 8 番目), A Novel Antifungal Compound Z-705 Specifically Inhibits Protein Kinase C of Filamentous Fungi, *Applied and Environmental Microbiology* (査読有), **2019**, 85, e02923-18.
- (4) 室川 哲郎, 榎本 賢, 寺西 貴昭, 小倉 由資, 桑原 重文, Total synthesis of JBIR-03 and asporyzin C, *Tetrahedron Letters* (査読有), **2018**, 59, 4107-4109.
- (5) 倉沢 一輝, 権 垠相, 桑原 重文, 榎本 賢, Bioinspired Total Synthesis of Delitschiapyrone A, *Organic Letters* (査読有) **2018**, 20, 4645-4648.
- (6) 高橋 和暉, 桑原 重文, 榎本 賢, Synthesis of aurachins B and H, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) **2017**, 81, 1466-1469.
- (7) 藤島 悠記, 小倉 由資, 十和田 諒, 榎本 賢, 桑原 重文, Stereoselective synthesis of the C17-C29 fragment of amphidinolide N, *Tetrahedron Letters* (査読有), **2016**, 57, 5240-5242.
- (8) 高橋 愛子, 小倉 由資, 榎本 賢, 桑原 重文, Enantioselective synthesis of the tricyclic core of (+)-strigol, *Tetrahedron* (査読有), **2016**, 72, 6634-6639.
- (9) 倉沢 一輝, 桑原 重文, 榎本 賢, Synthesis of bacilosarcins B and C, *Tetrahedron Letters* (査読有), **2016**, 57, 4997-4999.

〔学会発表〕(計 21 件)

- (1) 高橋 和暉, 桑原 重文, 榎本 賢, 推定生合成経路に基づく Agelamadin C の合成研究, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 1D4p12, 口頭, 2019 年 3 月 24 日, 東京.
- (2) 塚口 頌悟, 十和田 諒, 小倉 由資, 榎本 賢, 桑原 重文, Hetiamacin A-D の全合成, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 1D4p11, 口頭, 2019 年 3 月 24 日, 東京.
- (3) 榎本 賢, 倉沢 一輝, 権 垠相, 桑原 重文, Bioinspired Total Synthesis of Delitschiapyrone A, IKCOC-14 (The 14th, International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry), OP-11 (selected as oral presentation), 11/12-16, 2018, Kyoto.
- (4) 榎本 賢, Synthetic study of an ergot alkaloid, paspalinine, International Symposium on Nutrition & Human Health (Tohoku University – Texas A&M University Nutrition Symposium), oral, 11/2-3, 2018, College Station, Texas, USA.
- (5) 長島 生, 奥山 市子, 加我 晴生, 榎本 賢, 清水 弘, マイクロ波加熱による新規 1,6-アンヒドロ糖アミノ糖合成, 日本農芸化学会東北支部第 153 回大会, D15, 口頭, 2018 年 9 月 23 日, 仙台
- (6) 塚口 頌悟, 十和田 諒, 倉沢 一輝, 小倉 由資, 榎本 賢, 桑原 重文, 新規アミクマシ型天然物ヘチアマシン類の全合成研究, 日本農芸化学会東北支部第 153 回大会, D06, 口頭, 2018 年 9 月 23 日, 仙台.
- (7) 齋藤 克哉, 高橋 和暉, 桑原 重文, 榎本 賢, 対称的なエノールエーテル構造を持つ ketedonobisether の全合成研究, 日本農芸化学会東北支部第 153 回大会, D05, 口頭, 2018 年 9 月 23 日, 仙台.
- (8) 齋藤 克哉, 春成 円十郎, 五十嵐 康弘, 桑原 重文, 榎本 賢, 有機合成化学的手法による ketedonobisether の幾何異性解明研究, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 3A16p03, 口頭, 2018 年 3 月 17 日, 名古屋.
- (9) 塚口 頌悟, 十和田 諒, 倉沢 一輝, 小倉 由資, 榎本 賢, 桑原 重文, Hetiamacin 類の合成研究, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 3A16a06, 口頭, 2018 年 3 月 17 日, 名古屋.
- (10) 倉沢 一輝, 権 垠相, 桑原 重文, 榎本 賢, デリチアピロン A の生合成模倣合成, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 3A16a02, 口頭, 2018 年 3 月 17 日, 名古屋.

- (11) 榎本 賢, 倉沢 一輝, 權 垠相, 桑原 重文, 推定生合成経路に基づいた delitschiapyrone A の全合成, 第 112 回有機合成シンポジウム, O-15, 口頭, 2017 年 12 月 6 日, 東京 (早稲田大学).
- (12) 齋藤 克哉, 桑原 重文, 榎本 賢, ketedonobisether の幾何異性解明研究, 日本農芸化学会東北支部第 152 回大会, A03, 口頭, 2017 年 11 月 4 日, 秋田.
- (13) 倉沢 一輝, 權 垠相, 桑原 重文, 榎本 賢, 提唱生合成経路に基づいた delitschiapyrone A の全合成, 第 47 回複素環化学討論会, 講演要旨集, 1O-04, 口頭, 2017 年 10 月 26 日, 高知.
- (14) 高橋 和暉, 桑原 重文, 榎本 賢, Synthesis of Aurachins B and H, 平成 29 年度化学系学協会東北大会, 1p050, ポスター, 2017 年 9 月 16 日, 盛岡.
- (15) 佐藤 俊太郎, 福田 裕紀, 倉沢 一輝, 塚口 頌悟, 小倉 由資, 榎本 賢, 桑原 重文, 特異な環状構造を有する生物活性天然物の全合成, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2SY03-1, 口頭, 2017 年 3 月 18 日, 京都.
- (16) 室川 哲郎, 榎本 賢, 小倉 由資, 桑原 重文, asporyzin C の全合成研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2C15a08, 口頭, 2017 年 3 月 18 日, 京都.
- (17) 石井 紗也加, 桑原 重文, 榎本 賢, ktedonoketone 光学活性体の合成研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2C15a07, 口頭, 2017 年 3 月 18 日, 京都.
- (18) 高橋 和暉, 桑原 重文, 榎本 賢, Aurachin 類の合成研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2C15a06, 口頭, 2017 年 3 月 18 日, 京都.
- (19) 倉沢 一輝, 桑原 重文, 榎本 賢, パシロサルシン B および C の合成, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2C15a05, 口頭, 2017 年 3 月 18 日, 京都.
- (20) 倉沢 一輝, 桑原 重文, 榎本 賢, パシロサルシン B および C の立体選択的合成, 日本農芸化学会東北支部第 151 回大会, A08, 口頭, 2016 年 10 月 9 日, 鶴岡.
- (21) 石井 紗也加, 桑原 重文, 榎本 賢, 好熱性細菌が生産する ktedonoketone の合成研究, 日本農芸化学会東北支部第 151 回大会, A07, 口頭, 2016 年 10 月 9 日, 鶴岡.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/youki/seibutsuyuki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

(3) 連携研究者

連携研究者氏名: 此木 敬一

ローマ字氏名: Keiichi Konoki

連携研究者氏名: 北川 航

ローマ字氏名: Wataru Kitagawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。