

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08370

研究課題名(和文) Atpenin A5を基盤とした寄生虫選択性を有する新規抗寄生虫薬の創製

研究課題名(英文) Design, synthesis, and biological evaluation of the novel atpenin A5 derivatives as a nematode complex II inhibitor

研究代表者

有馬 志保 (Arima, Shiho)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：20276158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Complex II選択的阻害剤であるatpenin A5は、抗寄生虫としてのリード化合物として期待されている。しかしながら、寄生虫のみならず哺乳類のcomplex IIに対しても強い阻害活性を示すという問題点を有する。そこで本研究は、寄生虫のcomplex IIを選択的に阻害する新規誘導体の理論的な設計並びに構造活性相関研究により、atpenin A5を基盤とした寄生虫選択性の高い新規抗寄生虫薬の創製を目指し、新規atpenin A5誘導体を数種設計し合成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

強力なcomplex II阻害活性を有するatpenin A5を基盤とする新規抗寄生虫薬の開発を目指し、極めて効率的に、かつ理論的に独創的な創薬研究を進めることで、世界的に要望の高い新しいタイプの抗寄生虫薬の開発の実現に向けて重要な知見をもたらすことができた。また、得られる結果は創薬化学研究分野において、学術的に非常に価値のあるものになると考えている。

研究成果の概要(英文)：Atpenin A5 (1) was isolated from the fermentation broth of a fungal strain, *Penicillium* sp. F0-125, and was demonstrated to exhibit potent complex II inhibitory activity. Therefore, 1 is of interest as a new anthelmintic agent. However, the production level of 1 in culture was low, and it exhibited the same inhibitory activity towards both nematode and mammalian complex II. To introduce selectivity towards nematode complex II, a novel atpenin A5 derivatives were designed and synthesized. In this study, the author was reported in detail the design, synthesis, and biological evaluation of the novel atpenin A5 derivatives.

研究分野：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品化学 構造活性相関

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界で最も患者数の多い疾患であり、寄生虫症による死者は世界中で 300 万人に達するとされている。また衛生環境が整っていない発展途上国のみならず、地球温暖化に伴い、先進国においても寄生虫症が増加傾向にあるため、寄生虫症対策は世界的に重要な課題となっている。更に近年、現在用いられている抗寄生虫薬に対する耐性種の出現が見られることから、その数は増加傾向にある。そこで従来とは異なる作用機序を有し、耐性種にも有効な抗寄生虫薬の開発が急務と言える。寄生虫は哺乳類とは異なる嫌気的な電子伝達経路を有するため、これを特異的に阻害する物質は、種選択性の高い抗寄生虫薬となり得る。そこで北里大学北里生命科学研究所において、微生物培養液を対象に complex II 阻害剤の探索が行われた。その結果、非常に強力な寄生虫 complex II 阻害活性を有する atpenin A5 (1) が単離され、抗寄生虫薬開発のリード化合物として大きく期待された。しかし同化合物は、低生産性のため化合物の供給は容易ではなく、創薬研究は困難であった。また、哺乳類の complex II にも阻害活性を示すことも判明し (*J. Antibiot.* **1990**, 43, 1553.)、高い寄生虫選択性を有する新規誘導体の合成が必要と考えられた。そこで申請者が所属する研究室において、上記の問題を解決すべく atpenin A5 (1) の全合成研究がなされ、エナンチオ選択的全合成を達成することで大量供給に成功した (*J. Antibiot.*, **2009**, 62, 289. **Figure 1**)。

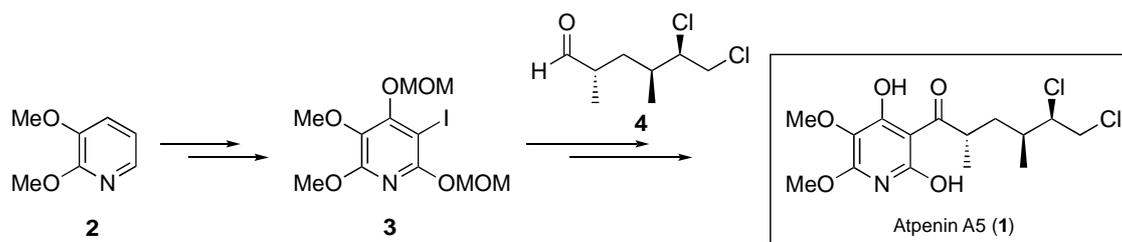


Figure 1 Atpenin A5 (1) の全合成

またこの、全合成経路を応用した構造活性相関研究 (第一次) も進め、現在までに 1 が有する各置換基ならびに立体配置の重要性を明らかにしてきた (**Figure 2**)。

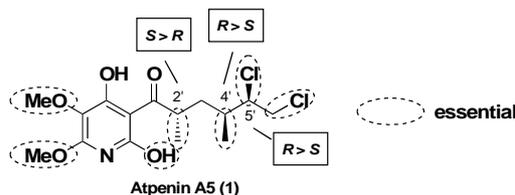


Figure 2. Atpenin A5 (1) の第一次構造活性相関研究に関するまとめ

2. 研究の目的

前述の通り、当初からの問題である哺乳類と寄生虫との種選択性の低さは未だ解決できていない。近年、申請者は、この問題を解決出来る大きな手がかりを得ることができた。すなわち、従来解明されていた 1 と哺乳類 (ブタ) の complex II との複合体構造に加え、これまで不明であった寄生虫 complex II の 3 次元構造 (*J. Biochem.* **2012**, 151, 589.) および 1 との共結晶に関する 3 次元構造が、研究協力者である長崎大・北らにより明らかとされたことである (未発表データ)。これにより、哺乳類ならびに寄生虫 complex II と 1 との共結晶 X 線構造解析の結果を参考にし、その結合様式の差を精査することで、寄生虫選択性を有する atpenin A5 誘導体の理論的な分子設計が可能となった。本研究は、これら最新の構造解析結果に基づき、申請者等が研究を重ねてきた新規誘導体合成技術と構造活性相関の評価系を用い、高い complex II 阻害活性を維持したまま、寄生虫選択性を向上させることを大きな目的とする。

3. 研究の方法

まず上記結果について詳細に解析したところ、哺乳類および寄生虫の complex II との結合時に 1 の側鎖 2' 位メチル基が位置する領域 (ポケット) において空間的な大きさの違いがあり、寄生虫 complex II の方が大きいことが明らかとなった。よって、側鎖 2' 位のメチル基をより嵩高い Bn 基に変換した誘導体を合成し、活性評価を行った結果、1 と比較して寄生虫 complex II に対する阻害活性は若干低下したものの、期待どおり寄生虫選択性が向上することを見出している (未発表データ)。従って、1 の側鎖 2' 位のメチル基を種々の置換基へと変換した誘導体群 (Group A) の合成を進め、2' 位周辺の構造活性相関を明らかにし、より高い寄生虫選択性の向上を目指すこととした。また別の戦略として、研究協力者である昭和大学薬学部・合田教授らにより、前述の X 線構造解析の結果を考慮した atpenin A5 誘導体の *in silico* 分子設計を行って頂いた。その結果、寄生虫 complex II に対してより高い選択性を有することが期待される新規誘導体群 (Group B) が提案された。 (**Figure 3**)

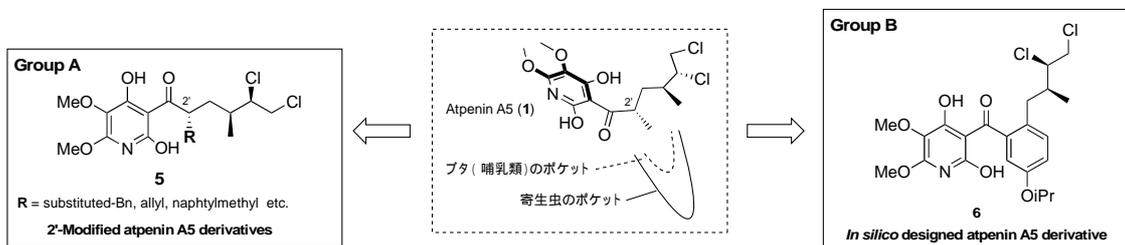
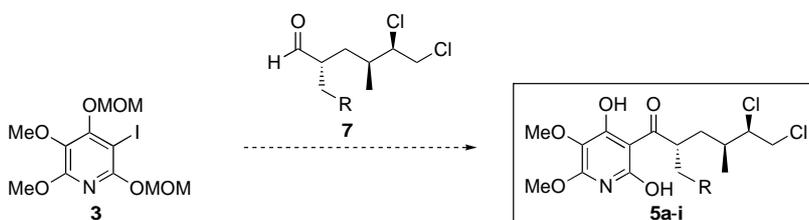


Figure 3. 新規 Atpenin A5 誘導体の設計 (第二次構造活性相関研究)

従って本研究では、上記のような 2 種の戦略のもと第二次構造活性相関研究を進め、atpenin A5 (1)を基盤とした寄生虫選択性を有する新規抗寄生虫薬の創製を目指すこととした。

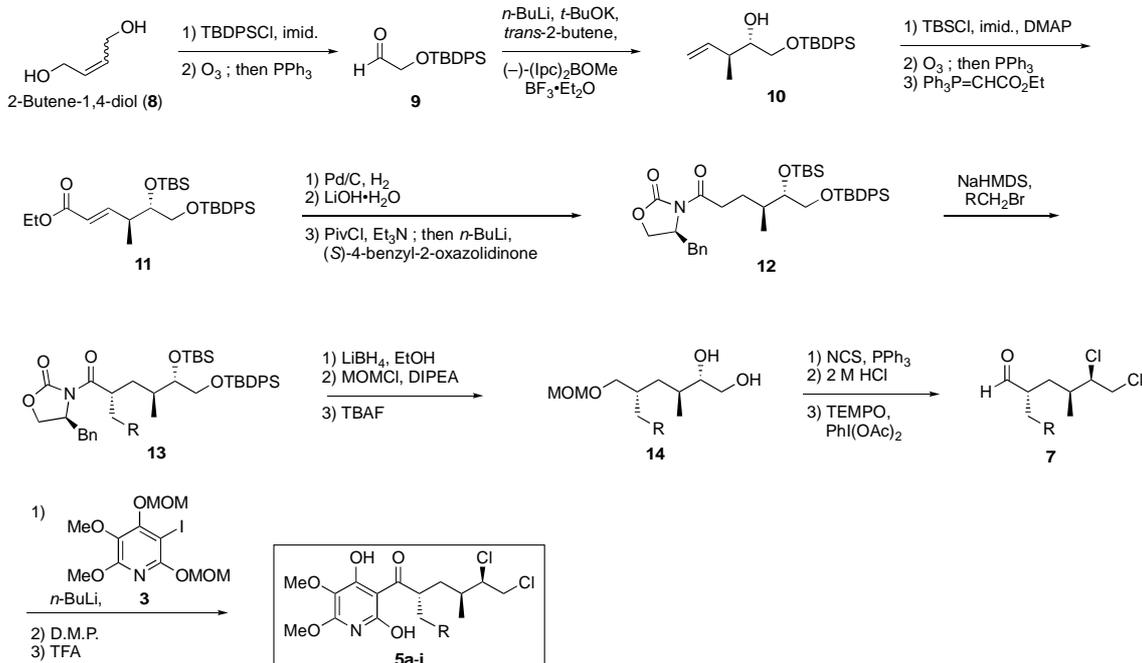
4. 研究成果

(1) まず始めに、1 の側鎖 2' 位のメチル基を種々の置換基へと変換した誘導体群 (Group A) の合成を行った。この合成は、1 の合成方法にならないアルコキシピリジン 3 と対応するアルデヒド 7 をカップリングするコンバージョンな方法を適用することとした。



Scheme 1. 2'-置換 atpenin A5 derivatives 5a-i の合成計画

出発原料に市販の 2-butene-1,4-diol (8) を使い、ヒドロキシ基を TBDPS 基で保護した後、オゾン分解を行いアルデヒド 9 へと変換し、Brown の不斉クロチル化を行うことでアルコール 10 (*J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5048.) を得た。続いて、生じた 2 級ヒドロキシ基を TBS 基で保護し、オゾン分解、Wittig 反応を経て α,β -不飽和エステル 11 とし、接触還元、エステルの加水分解、混合酸無水物を經由した不斉補助基の導入を行い、共通中間体 12 へと導いた。その後、対応するベンジルハライドを用いた立体選択的なアルキル化を行い 13 とし、不斉補助基の除去、1 級アルコールの MOM 基による保護、脱シリル化を行うことでジオール 14 へと変換した。続いて、Cl 化、MOM 基の脱保護、1 級アルコールの酸化により、アルデヒド 7 を合成した。その後、テトラアルコキシピリジン 3 とのカップリング、酸化、脱保護を経て望みの誘導体 5a-i の合成を達成した (Scheme 2)。



Scheme 2. 2'-置換 atpenin A5 誘導体 5a-i の合成

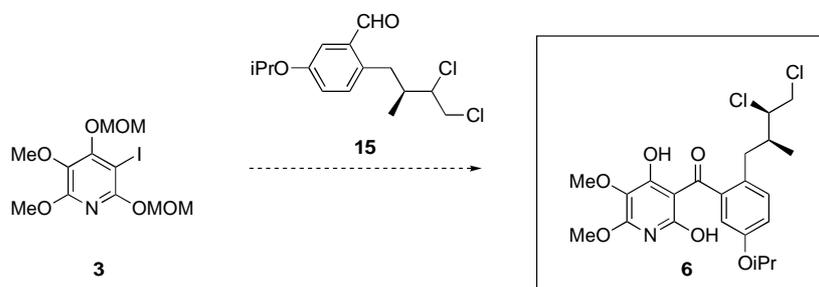
続いて、合成した誘導体 5a-i の活性評価を行った (Table 1)。その結果、5 つの誘導体 (5a-c, 5e, 5f) の寄生虫 complex II に対する阻害活性は、1 より低下したものの、未だ nM オーダーの活性を維持することが明らかとなった。しかし、5d や 5g-i のように嵩が大きい置換基を導入すると、顕著に阻害活性が低下した。次に、哺乳類 complex II に対する阻害活性と種選択性に注目すると、誘導体 5a-c, 5e において寄生虫選択性が発現し、中でもフェニル基上の *o*-位に Me 基を持つ誘導体 5b は、今までにない高い寄生虫選択性 (S.I. = 40) を示すことが明らかとなった。しかし、中には寄生虫選択性を示さない誘導体 (5d, 5e) があることから、寄生虫選択性発現の要因を探るべく、今後、導入する置換基の詳細な検討が必要であることが示された。著者が行った本研究は、1 を基盤とした抗寄生虫剤創製の重要な知見になると考えられる。

compound	R	IC ₅₀ (nM)		S.I.*
		complex II from <i>A. suum</i> . adult Muscle (nematoda)	complex II from bovine heart (mammalian)	
Atpenin A5 (1)	H	14	3.6	0.26
5a	Ph	280	700	2.8
5b	<i>o</i> -MePh	150	6000	40
5c	<i>m</i> -MePh	180	500	2.8
5d	<i>p</i> -MePh	1800	300	0.17
5e	<i>o</i> -biphenyl	500	160	0.32
5f	<i>p</i> -biphenyl	500	1500	3.0
5g	1-naphthyl	1500	n.d.	-
5h	2-naphthyl	1600	n.d.	-
5i	<i>o,o</i> -dimethylPh	4000	n.d.	-

*selectivity index (S.I.) : IC₅₀ (complex II from bovine heart) / IC₅₀ (complex II from *A.suum*.)
n.d. : no data

Table 1. Atpenin A5 (1)と 2'-置換 atpenin A5 誘導体 5a-i の complex II 阻害活性評価

(2)次に *in silico* 分子設計により提案された新規誘導体群 (Group B) の合成を試みた。この合成も、上述の誘導体群 (Group A) の合成と同様に 1 の合成方法にならないアルコキシピリジン 3 と対応するアルデヒド 15 をカップリングするコンバージョンな方法を適用することとした (Scheme 3)。



Scheme 3. *In silico* ドラッグデザインによる atpenin A5 新規誘導体 6 の合成計画

Scheme 4 に誘導体 6 の合成を示す。まず、2-amino-5-hydroxybenzoic acid (16) に対し 2 工程でアリールヨージド 17 に導いた。次いで、市販の 2-(benzyloxy)ethanol (18) の酸化、Wittig 反応を onepot で行った後、得られたエステルを還元、続く Sharpless の不斉エポキシ化反応によりエポキシアルコール 19 とした。続いて得られた 19 の位置選択的エポキシドの開裂、得られたジオールのアセタール保護により 20 とし、加水素分解による Bn 基の除去後、ヒドロキシ基をヨウ素化することでアルキルヨージド 21 とした。次いで、B-alkyl 鈴木カップリングの条件にて 21 と 17 のカップリングを行い 22 へと導いた後、アセタールの脱保護、生じたヒドロキシ基のジクロロ化により 23 とし、DIBAL 還元、TEMPO 酸化によりアルデヒド 15 とした。その後、テトラア

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lee Daiki, Kondo Hiroki, Kuwayama Yui, Takahashi Kento, Arima Shiho, Omura Satoshi, Ohtawa Masaki, Nagamitsu Tohru	4. 巻 75
2. 論文標題 Total synthesis of 4-epi-atpenin A5 as a potent nematode complex II inhibitor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 3178 ~ 3185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2019.02.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohtawa M.; Yano, K.; Miyao, A.; Hiura, T.; Sugiyama, K.; Arima S.; Kita, K.; Omura, S.; Nagamitsu T.	4. 巻 60
2. 論文標題 Structure-activity relationship studies of atpenin A5 analogs with chemical modification of the side chain moiety	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 1037-1042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2019.03.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有馬志保、大多和正樹、清水理紗、大村 智、長光 亨
2. 発表標題 Nafuredin- の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第138年会(金沢)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有馬志保、大多和正樹、長光 亨
2. 発表標題 Atpenin A5の構造活性相関研究
3. 学会等名 第39回白金シンポジウム(東京)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 有馬 志保、杉山 晃平、樋浦 徹、矢野 圭祐、李 大葵、大多和 正樹、北 潔、大村 智、長光 亨
2. 発表標題 AtpeninA5の構造活性相關研究
3. 学会等名 第10回北里化学シンポジウム(神奈川相模原)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考