

機関番号：32659

研究種目：若手研究（研究活動スタート支援）

研究期間：2009～2010

課題番号：21890262

研究課題名（和文）

ハイブリッド型天然物を範とする新世代抗菌剤の医薬分子設計と分子機能探索

研究課題名（英文）

Natural Product Hybrids: Design, Synthesis and Evaluation of Novel Antimicrobial Agents

研究代表者

薬師寺 文華 (YAKUSHIJI FUMIKA)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40548476

研究成果の概要（和文）：

- 1) ハイブリッド型天然物チオマリノール類において、抗菌活性剤開発を念頭においたハイブリッド型チオマリノール誘導体の分子設計及び合成を行った。まず、報告者が開拓した全合成経路をもとに誘導可能である合成中間体を考案し、ホロチン部とのハイブリッド型化合物を設計した。続いて、設計した合成中間体より、シュードモン酸部位誘導体の合成を行い、ホロチン部との縮合を試みることで、ハイブリッド型化合物の構築法を確立した。
- 2) 新規作用機序により抗菌活性作用を示すが、高脂溶性であるため狭域抗菌スペクトルであるミキサピロニン類に着目し、チオマリノール類が含有するホロチン部とのハイブリッド型分子として再設計することで新規医薬候補化合物の獲得を目指すこととした。まず、分子モデリングを用いてハイブリッド型誘導体を設計後、合成研究を展開することで、新規ハイブリッド型誘導体を得ることができた。これらの合成中間体とともにペーパーディスク法による抗菌活性試験、及び最小発育阻止濃度（MIC）測定を行ったところ、ミキサピロニンを凌ぐ活性を与える興味深い新規医薬シーズを獲得することができた。

研究成果の概要（英文）：

- 1) Previously, the total syntheses of hybrid type natural products 'thiomarinols' were accomplished by author. Thiomarinols were found to exhibit potent antimicrobial activity, which came from hybrid structure: pseudomonic acid part and holothin part. Based on the synthetic pathway, hybrid type derivatives as antimicrobial agents were designed and synthesized. The structure-activity relationship studies and optimization are now in progress.
- 2) Myxopyronins were isolated from *Myxococcus fulvus* Mx f50 and found to exhibit antimicrobial activity, which inhibition mechanism was reported as a novel pathway. However, myxopyronin revealed high lipophilicity and limited membrane permeability which are inadequate aspects for a drug. This time, design and synthesis of novel hybrid-type derivatives of myxopyronins with the strategy of linking holothin part, which included in thiomarinols, were attempted to improve lipophilicity and cell permeability for broad antibacterial spectrum. Synthesized derivatives were evaluated as antimicrobial agents, and some derivatives showed more potent activity than myxopyronins against gram-positive bacterias on minimal inhibitory concentration (MIC) results. According to this hybrid strategy, novel antimicrobial derivatives were obtained and structural optimization is now in progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
総計	2,040,000	652,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ハイブリッド、抗菌活性、RNA ポリメラーゼ、Holothin, Myxopyronin, Thiomarinol

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 自然界に存在するハイブリッド分子には強力な生理活性を有するものが多く、創薬科学上大きく注目され始めている。しかし、ハイブリッド型化合物を用いた創薬研究の歴史は浅く、新規医薬品シーズの開発において、多大な可能性を秘めた一分野であると言える。著者はこれまでにホロチン部とシュードモン酸部よりなるハイブリッド型抗菌活性天然物チオマリノール A 及び B の全合成研究を行い、初めての全合成を達成するとともに、その特異な構造及び強力な生理活性に着目してきた。この強力な抗菌活性作用は、ホロチン部とシュードモン酸部からなるハイブリッド構造に由来することは、単離グループによりすでに明らかにされている。グラム陽性菌から陰性菌まで幅広い抗菌スペクトルを有することに加え、MRSA に対する MIC がいずれも 0.01 ug/ml 以下と、市販薬のバンコマイシン (1.56 ug/ml) やムピロシリン (0.2 ug/ml) と比較すると格別強力である点は注目に値する。故に、単離した三共グループによって種々の誘導体が合成され、構造活性相関が実施されているようだが、その誘導体群について述べた公開特許論文中には薬理活性試験のデータは無く、詳細は明らかにされていない。また、シュードモン酸誘導体の全合成を行った Hall らも創薬研究への展開を報告しているが、その誘導体創製はシュードモン酸部位のみに留まり、ハイブリッド構造を念頭においた医薬品シーズの探索とは着眼点が異なるものである。そこで著者は、チオルチン型クロモフォアであるホロチン部と、シュードモン酸部が同一分子内に存在する「ハイブリッド構造」を保持した機能性分子の設計と、化合物ライブラリーの構築、続く構造活性相関の実施へと展開することで、チオマリノール類を範とする新世代抗菌活性剤の開発を行うこととした。

(2) また、ホロチン部は、構造、物性ともに大変興味深いことに加え、RNA 合成阻害活性や殺細胞活性を示すことから、医薬品シーズとして注目するに値する分子である。チオマリノール類の構造活性相関研究の中で、ホロチン部は、細菌細胞への移行性を高める役割を担っていることが明らかにされており、種々の化合物とハイブリッド構造を形成することで、抗菌活性起爆剤として有効に機能する可能性が十分考えられる。これより、種々検討した結果、細菌細胞選択的な

RNA ポリメラーゼ阻害活性を有するミキソピロニン及びリポスタチンとの「合成ハイブリッド型化合物」をデザインすることで、新規抗菌活性剤の開発を試みることにした。

#### 2. 研究の目的

本研究は、(1)ハイブリッド型天然物 チオマリノール類の化合物ライブラリー構築、続く、構造活性相関の実施、並びに、(2)構造・物性ともに興味深いホロチン部との新規合成ハイブリッド型化合物の医薬分子設計、誘導体合成を行い機能性分子を探索することで、新世代抗菌活性剤の開発へと展開することを目的としている。

#### 3. 研究の方法

本研究の目的に従い、(1)著者が以前全合成研究を行ったチオマリノール類の全合成経路より導かれる合成中間体をもとに、ホロチン部とのハイブリッド機能を保持した誘導体を設計、合成することにより、チオマリノール類の化合物ライブラリーを構築する。また、(2)魅力的な生理活性を有するが、高脂溶性分子であるため創薬研究が立ち後れているミキソピロニン及びリポスタチンにおいて、極性基であるホロチン部とのハイブリッド型分子として再設計するとともに、種々の誘導体を合成し、化合物ライブラリーを構築する。続いて、(3)立ち上げたライブラリーの構造活性相関を実施し、分子機能探索を行うとともに、設計分子の最適化を行うことで、創薬合成研究へと展開する。

#### 4. 研究成果

(1) 上記着想を基に、チオマリノール誘導体の分子設計及び合成を行うことで、化合物ライブラリーの構築を試みた。即ち、著者が開発した全合成ルートをもとに誘導可能である合成中間体を考案し、ホロチン部とのハイブリッド型化合物を設計した。続いて、合成中間体を基盤としたシュードモン酸部位誘導体の合成を行い、ホロチン部との縮合反応を試みることで、ハイブリッド型化合物の合成法を確立した。今後は、本合成法を設計した種々の分子に適用することで、化合物ライブラリーの構築、抗菌活性試験の実施、構造最適化へと進展する予定である。

(2) 続いて、ミキソピロニンとホロチン部との新規合成ハイブリッド型化合物の医薬分子

設計、誘導体合成に関して述べる (Figure 1)。

【ハイブリッド型分子設計】

ハイブリッド型分子の分子設計は、Figure 2 に示すミキソピロニンと標的部位である細菌 RNA ポリメラーゼの共結晶による X 線構造解析をもとに行った。ミキソピロニンは細菌 RNA ポリメラーゼの蝶番部位に進入し、その機能を阻害する。これより、以下2種のアプローチによるハイブリッド型分子設計を行うこととした (Figure 3)。

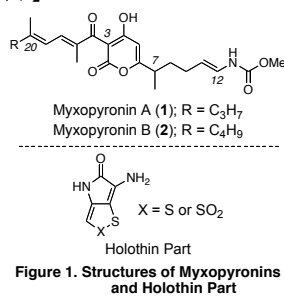


Figure 1. Structures of Myxopyronins and Holothin Part

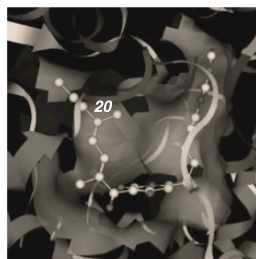
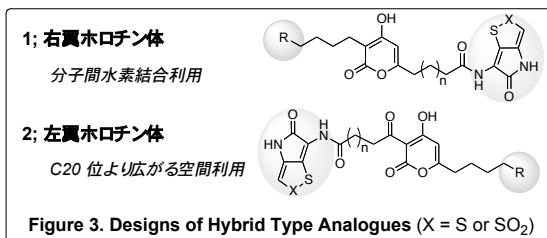


Figure 2. Modeling Structure of Myxopyronin



- ① ミキソピロニンカーバメート部位が関与する水分子を介したタンパク部位との水素結合を基に、右側鎖末端にホロチン部を導入し、タンパクとの相互作用を見出す。
- ② ミキソピロニン C20 位炭素鎖方向に広がる空間を基に、左側鎖末端にホロチン部を導入し、蝶番部位との相互作用を見出す。

【ハイブリッド型分子合成】

以上の分子設計をもとに、ハイブリッド型分子の合成を行った。ミキソピロニンのハイブリッド型誘導体合成においては、ミキソピロニンラセミ体の全合成例を参考に構築を行うことで、10 種の新規ハイブリッド型誘導体を得ることができた。まず既存の合成ルートを用いてカルボン酸 **3**, **4** を合成後、ホロチン部と縮合させる事で右翼ホロチン体 **8-10** の合成を行った。また、独自の合成法にてカルボン酸 **5-7** を構築後、左翼ホロチン体 **11-14** を合成した。Figure 4 に示すホロチン部とのハイブリッド型分子 **8-14** はいずれも新規化合物である。

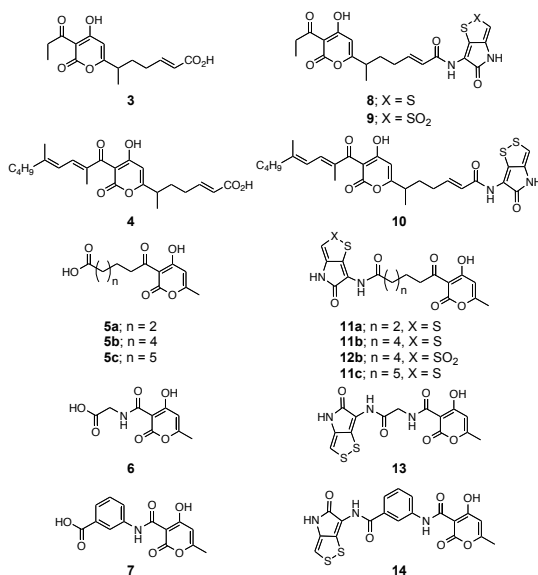


Figure 4. Myxopyronin Analogues

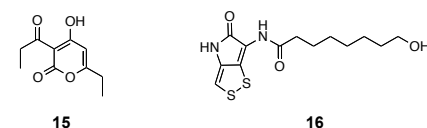


Figure 5. Other Derivatives

【ハイブリッド型化合物抗菌活性評価】

続いて、合成化合物の抗菌活性を評価した。合成ハイブリッド型化合物 **8-14** について、リファンピシン (RFP) を正対照とし、各々 30 μg を用いて枯草菌に対する抗菌活性試験 (ペーパーディスク試験法; ペーパーディスク 8 mm) を実施したところ、**10** 及び **11a-c**, **13** において活性を認めることが出来た。また、カルボン酸 **3**, **5a**, **6**, **7** についても同様に活性評価を行った結果、カルボン酸化合物群は活性を示さないことが明らかとなった。また、別途合成した化合物 **15**, **16** についても活性試験を行った (Figure 5)。Figure 6 にペーパーディスク試験法により得られた阻止円 (mm) を示す。これより、ハイブリッド型誘導体 5 種において抗菌活性を示すことが明らかとなったことから、比較的強力な抗菌活性を示したハイブリッド型誘導体 2 種 (**11c**, **13**) に対してグラム陽性菌・陰性菌、真菌計 8 菌株を用いた最小阻止濃度 (MIC) 測定を行ったところ、いずれも *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* に対してミキソピロニンを凌ぐ活性を与えることが明らかとなった (Table 1)。

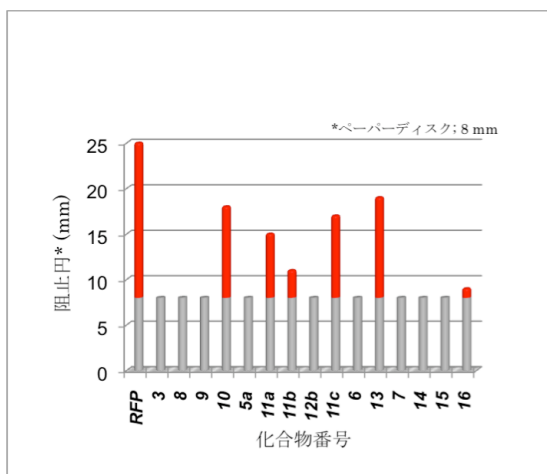


Figure 6. Results of Paper Disc Assay

Table 1. Antimicrobial activity

Samples	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	RFP	11c	13	Myxopyronin A (1) B (2)	
1. <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC29213)	0.25	4	8	1	0.3
2. <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC29212)	0.5	4	8		
3. <i>Micrococcus luteus</i> (ATCC9341)	$\leq 0.125$	1	2	12	3.1
4. <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC6633)	$\leq 0.125$	8	8	50	12.5
5. <i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	8	$\geq 256$	8	>100	
6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	16	128	32	>100	
7. <i>Serratia marcescens</i> (ATCC13880)	16	$\geq 256$	8	no zone <sup>a)</sup>	
8. <i>Candida albicans</i> (ATCC10231)	$\geq 256$	$\geq 256$	16	no zone <sup>a)</sup>	

a) The paper disk diffusion assay.

以上より、本ハイブリッド型分子創製戦略により興味深い新規医薬シーズ獲得に至り、物質特許出願へとつなげることができた。今後は更なる誘導体合成続く抗菌活性試験により、構造最適化を行う予定である。

#### 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 2 件)

① Yamazaki, Y., Kido, Y., Hidaka, K., Yasui, H., Kiso, Y., Yakushiji, F., Hayashi, Y., 'Tubulin photoaffinity labeling study with a plinabulin chemical probe possessing a biotin tag at the oxazole', *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有り, 19 (2011), 595-602.

② Nishiguchi, S., Sydnes, O. M., Taguchi, A., Regnier, T., Kajimoto, T., Node, M., Yamazaki, Y., Yakushiji, F., Kiso, Y. and Hayashi, Y., 'Total Synthesis of (+)-Negamycin and Its 5-epi-Derivative', *Tetrahedron*, 査読有り, 66 (2010), 314-320.

[学会発表] (計 13 件)

① 薬師寺文華, 岡本玲子, 久能佑樹, 宮本

裕子, 山崎有理, 林良雄, 「ハイブリッド型ミキソピロニン類縁体による新世代抗菌活性剤創製研究」, 第 131 回日本薬学会年会, 2011, 3, 28-31, 静岡

② 田中達也, 薬師寺文華, 岩橋孝祐, 山崎有理, 林良雄, 「Huisgen 反応を利用した血管遮断剤 Plinabulin 水溶性プロドラッグの創製」, 第 131 回日本薬学会年会, 2011, 3, 28-31, 静岡

③ 薬師寺文華, 岡本玲子, 山崎有理, 林良雄, 「新世代抗菌剤開発を指向したハイブリッド型ミキソピロニン類縁体の合成研究」, 第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2010, 11, 17-19, 京都

④ 薬師寺文華, 田中達也, 岩橋孝祐, 山崎有理, 林良雄, 「微小管重合阻害剤 Plinabulin における水溶性プロドラッグの創製」, 第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2010, 11, 17-19, 京都

⑤ Yakushiji, F., Yoshida, M., Maddaluno, J., Hayashi, Y., Shishido, K., 'First Total Syntheses of Thiomarinols A and B', 18<sup>th</sup> IUPAC International Conference on Organic Synthesis, 2010, 8, 1-6, Bergen, Norway

⑥ 薬師寺文華, 岡本玲子, 山崎有理, 林良雄, 「ハイブリッド型ミキソピロニン類縁体の合成研究」, 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山

⑦ Yakushiji, F., Yoshida, M., Maddaluno, J., Hayashi, Y., Shishido, K., 'Total Synthesis of Thiomarinols A and B', ACS Spring 2010 National Meeting & Exposition, 2010, 3, 21-25, San Francisco, USA

⑧ 薬師寺文華, 吉田昌裕, Jacques Maddaluno, 林良雄, 宍戸宏造, 「チオマリノール A 及び B の全合成」, 第 35 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2009, 11, 16-17, 金沢

⑨ Yakushiji, F., Nishiguchi, S., Sydnes, O. M., Taguchi, A., Regnier, T., Kajimoto, T., Node, M., Kiso, Y., Yamazaki, Y., and Hayashi, Y., 'Synthesis of (+)-Negamycin and Derivatives', 3<sup>rd</sup> Asia-Pacific International Peptide Symposium, 2009, 11, 8-11, Jeju, KOREA

[産業財産権]

○出願状況（計1件）

名称：ミキソピロニン誘導体含有抗菌剤

発明者：薬師寺文華

権利者：薬師寺文華, 林良雄

種類：基本特許（物質特許）

番号：特願 2011-70428

出願年月日：2011, 3, 28

国内外の別：国内

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

薬師寺 文華 (YAKUSHIJI FUMIKA)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40548476