

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究 A

研究期間：2010～2012

課題番号：22689004

研究課題名（和文） 天然物を基盤とする包括的な抗薬剤耐性菌薬のリード創出研究

研究課題名（英文） Development of novel antibacterial leads based on natural products

研究代表者

市川 聡 (ICHIKAWA SATOSHI)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：60333621

研究成果の概要（和文）：本申請研究は、抗菌天然物の抗菌スペクトルの拡大と低分子化による新規抗薬剤耐性菌薬のリードを創出することを目的とする。ムライマイシン、パシダマイシンの全合成を達成するとともに、これらの誘導体の構造活性相関を検討した。またカプラザマイシンの大幅な単純化を論理的に行い、分子量が約半分であるオキサゾリジン誘導体が天然物とほぼ同等の抗菌活性を有し、またメチシリン耐性黄色ブドウ球菌やバンコマイシン耐性腸中菌などの薬剤耐性菌にも広く有効であることもわかった。ムライマイシンについても、分子量が約半分である単純化誘導体を見いだした。これらの研究から、標的酵素 MraY との結合様式を提案することができた。

研究成果の概要（英文）：The caprazamycins (CPZs), muraymycins (MRYs), and mureidomycins (MRDs) which constitute a class of nucleoside natural products, exhibit excellent antimicrobial activity against. This work presents a total synthesis, systematic structure-activity relationship (SAR) study, and simplification of CPZs, MRYS, and MRDs. The analogues exhibited good activity against a range of Gram-positive bacterial pathogens, including MRSA and VRE. The oxazolidine analogues were developed through simplification of CPZs, and they exhibited antibacterial activity with a similar potency to the CPZs. Our SAR study of the CPZs and MRYS suggests a probable mechanism for inhibition of the MraY.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 12,100,000 | 3,630,000 | 15,730,000 |
| 2011年度 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |
| 2012年度 | 4,300,000 | 1,290,000 | 5,590,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 20,200,000 | 6,060,000 | 26,260,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：天然物、有機合成、創薬化学、薬剤耐性菌

1. 研究開始当初の背景

元来、生理活性を指標に発見されてきた天然物は、重要な創薬リード分子である。

2006年までの25年間に承認された医薬品974個のうち、半数以上が天然物に関連している (Newman, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*,

2589.)。しかし培養・発酵から豊富に得られ、かつ半合成が可能である場合を除けば、複雑な構造を有する天然物をリードとして創薬研究を進めることは難しい。天然物をリードとする創薬研究を行うには、新規反応による高効率な合成法の開発、もしくは活性を保持しつつドラッグデザインによる**構造の単純化**が必要となる。このプロセスは **function oriented synthesis (FOS, Wender, et al. Acc. Chem. Res. 2001, 41, 40.)** とも呼ばれ、これからの創薬研究にはますます重要になる。

これまで申請者は、多剤耐性菌に対する新規抗菌剤の開発を指向して、カプラザマイシン類の FOS 研究を行ってきた。カプラザマイシンは、細菌の細胞壁であるペプチドグリカンの生合成酵素の一つであるトランスロカゼ I (MraY) を強力に阻害し、薬剤耐性結核菌に対しても活性なこと、*in vivo* においても毒性が認められないことから、新規抗結核薬開発のリードとして期待されている。申請者は、カプラザマイシンの活性発現に必須な構造が 5'-O-β-アミノリボシルグリシルウリジン部であると予測し、これを独自のβ-選択的リボシル化反応を開発することで、コア構造である**カプラゾールの初の全合成**を達成した。さらに各種誘導体合成を展開した結果、脂肪酸側鎖を単純化した誘導体であるパルミトイルカプラゾールが、天然物と同等の抗結核菌活性を有するばかりでなく、臨床現場で大きな問題となっているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 等の**薬剤耐性菌に対しても有効**であることを明らかにした。

2. 研究の目的

MRSA や VRE、多剤耐性緑膿菌 (MDR-PA)、超薬剤耐性結核菌 (XDR-TB) 等の蔓延を阻止することは全世界的要請である。一般に、複雑な構造を有する天然物をベースとして創薬展開するには、誘導体合成とその構造活性相関の検討に時間・コストがかかるうえ、一般に高分子量化合物の細胞・体内動態は悪い。そのため、これらの構造を劇的に単純化する必要がある。天然物のランダムな低分子化に終始する従来の誘導体合成では、活性を保持した化合物は見いだせない。本申請研究は、これまでの基礎的研究を発展させ、抗菌スペクトルの拡大と低分子化による新規抗薬剤耐性

菌薬のリードを創出することを目的として、以下の項目を遂行するものである。

(1) 作用機序を同一とする複数の天然物に関して、天然物間でのフラグメントを共有しうるような合成法をそれぞれについて確立する。カプラザマイシンの他に、MraY を強力に阻害する天然物がある。ムレイドマイシンはグラム陰性菌である緑膿菌、ムライマイシンはグラム陽性菌に活性を示し、カプラザマイシンと比較すると、それらの抗菌スペクトルは異なる。このように MraY 阻害天然物群としての抗菌スペクトルは幅広い。そこで、**ムレイドマイシンとムライマイシンの初の全合成**を達成し、MraY 阻害天然物群を獲得する。本合成法は、後の創薬展開に必要な骨格変換を想定した全合成法を開発するという特色を有する。

(2) ファーマコフォアの劇的な単純化をはかり、ハイブリッド型天然物群を低分子化する。3つの天然物は、いずれも分子量が 1000 を越し、極性官能基を多数有する複雑な化合物である。分子量問題は、天然物をリードとした創薬研究を行う上での共通の問題であり、ドラッグデザインによる積極的な構造の単純化が必要である。特に、カプラザマイシン、ムライマイシンのファーマコフォアといえる 5'-O-β-アミノリボシルグリシルウリジンの単純化は低分子化には避けては通れない。そこで、5'-O-β-アミノリボシルグリシルウリジン部の**大幅な単純化を理論的に行う**。ムライマイシン、ムレイドマイシンに含まれるペプチド部についても同様の単純化を検討する。この化合物群を用いて、多剤耐性菌に対して有効な化合物を探索し、新規抗多剤耐性菌薬のリードを創出することを最終目的とする。

3. 研究の方法

後の創薬展開に必要な骨格変換を想定して、Ugi 4成分反応による収束的連結法を用いて、ムレイドマイシン、ムライマイシンの全合成を達成する。この際、天然物間で、各フラグメントを共用しうるように各フラグメントを設計する。また、化合物の溶液中のコンフォメーション解析に基づいて、カプラザマイシン、ムライマイシンのファーマコフォアの大幅な単純化を論理的に行う。合成した化合物については、細菌細胞壁結合活性、MraY 阻害活性、抗菌活性評価の3つを随時行い、迅速な構造-活性相関を検討する。

4. 研究成果

(1) ムライマイシンはウリジン部位が、3ないし4個のアミノ酸を含むペプチドと結合した天然物である。MraY 阻害活性発現に必須な構造と、活性に必須ではないが、MraY との結合能を高めたり、抗菌スペクトルに影響するアクセサリ部位とに分割し、各フラグメントの合成を行った。非天然アミノ酸であるエピカプレオミジンは、D-チロシンから調製したスルファマート体に対して、ロジウム触媒を用いた C-H アミノ化反応を鍵反応として、高収率かつ高立体選択的に合成した。また 5'-O-β-アミノリボシルグリシルウリジン誘導体をイソントリル体へと変換した。各フラグメントを用いて、合成終盤での Ugi 4 成分反応により一挙に母骨格を合成することで、ムライマイシン D2 の全合成を達成した。本反応を用いることで合成工程数の大幅な削減ができ、効率的な化合物の供給が可能となった。そこで、各種ムライマイシン誘導体を合成し、その抗菌活性を評価した結果、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌やバンコマイシン耐性腸中菌などの薬剤耐性菌にも広く有効な誘導体をみいだした。

ムレイドマイシンの類縁化合物であるパシダマイシンDの全合成を以下のとおり行った。非天然型アミノ酸であるジアミノブタン酸を調製し、アミノ酸3残基を順次縮合することで、テトラペプチドカルボキサミドを合成した。4',5'-不飽和ウリジンを、ヨウ素化試薬 IDCT で処理する事で、Z-ビニルヨウ素体を高収率かつ高立体選択的に合成した。銅触媒を用いたクロスカップリングにより、Z-ビニルヨウ素体と先に合成したテトラペプチドカルボキサミドを連結した。最後に脱保護を行う事で、パシダマイシンDの初の全合成を達成した。同経路を用いて、3'-ヒドロキシ誘導体も合成した。3'-ヒドロキシ体は、天然物と同等の酵素阻害活性・抗菌活性を有する事がわかった。次に各種誘導体合成を指向して、本合成経路の改良を行い、Ugi 4 成分反応を基軸とした合成経路も確立した。本法を用いて、各種ハイブリッド化合物を合成した。

ムレイドマイシンについては、パシダマイシンDと同様にして、3'-ヒドロキシ体を合成した。

(2) まず以下のとおり、カプラザマイシンの 5'-O-β-アミノリボシルグリシルウリジンの大幅な単純化を論理的に行った。細胞膜内酵素である MraY は、X 線や NMR による構造解析が難しいため、構造に基づいた薬物設計が出来ない。具体的な方法としては、まず各種 NMR 測定並びに分子力場計算を用いて、天然物の溶液中のコンフォ

メーション解析を行い、活性発現に必要とされる鍵官能基の三次元空間配置を規定する要因を解析した。その結果、アミノリボースに含まれるアミノ基とウリジンが重要な役割を果たしており、ジアゼパノン環と 5'位のリボースは、先の二つの部位を2つの構造を適切な空間配置に保持していると予想した。6'位の窒素原子と 1''位の炭素原子を結合すればアミノ基とウリジンの配座制限が可能で、ジアゼパノン環と 5'位のリボースは除去できると考え、ジアゼパノン環と 5'位のリボースの2つの構造を、1つのオキサゾリジンに集約した単純化誘導体を設計した。次にこの解析に基づいて、鍵官能基を適切な空間配置に保持できるような単純な構造として、オキサゾリジン誘導体を設計し、各種誘導体を合成し、これらの構造-活性相関を検討した。その結果、活性を保持する単純化化合物を見出した。分子量が約半分であるオキサゾリジン誘導体が、天然物とほぼ同等の抗菌活性を有することも見いだした。またメチシリン耐性黄色ブドウ球菌やバンコマイシン耐性腸中菌などの薬剤耐性菌にも広く有効であることもわかった。オキサゾリジン誘導体の分子量は、カプラザマイシン類の約半分であり、分子量の大幅な低減に成功した。

ムライマイシンについては、各種単純化誘導体を合成し、その抗菌活性を評価した結果、分子量が約半分である単純化誘導体が、天然物とほぼ同等の抗菌活性を有することを見いだした。また、これらの構造・活性相関研究から、標的酵素 MraY との結合様式を提案した。

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 13 件)

- ① Okamoto, Kazuya; Sakagami, Masahiro; Feng, Fei; Fumiyo, Takahashi; Kouichi, Uotani; Togame, Hiroko; Takemoto, Hiroshi; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda Akira.* Synthesis of Pacidamycin Analogue via an Ugi-multicomponent Reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, 22, 4810-4815. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.05.050
- ② Okamoto, Kazuya; Sakagami, Masahiro; Feng, Fei; Togame, Hiroko; Takemoto, Hiroshi; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda Akira.* Total Synthesis and Biological Evaluation of Pacidamycin D and Its 3'-Hydroxy Analogue. *J. Org. Chem.*, 2012, 77, 1367-1377. (査読有)
DOI: 10.1021/jo202159q

- ③ Muranaka, Kazuhiro; Ichikawa, Satoshi* and Matsuda, Akira.* Development of the Carboxamide Protecting Group, 4-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-2-methoxybenzyl. *J. Org. Chem.*, 2011, 76, 9278-9293. (査読有)
DOI: 10.1021/jo201495w
- ④ Okamoto, Kazuya; Sakagami, Masahiro; Feng, Fei; Togame, Hiroko; Takemoto, Hiroshi; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda Akira*. Total Synthesis of Pacidamycin D by Cu^(I)-Catalyzed Oxy Enamide Formation. *Org. Lett.*, 2011, 13, 5240-5243. (査読有)
DOI: 10.1021/ol202124b
- ⑤ Tanino, Tetsuya; Al-Dabbagh, Bayan; Mengin-Lecreux, Dominique; Bouhss, Ahmed; Oyama, Hiroshi; Ichikawa, Satoshi* and Matsuda, Akira. Mechanistic Analysis of Muraymycin Analogues: a Guide to the Design of MraY Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 8421-8439. (査読有)
DOI: 10.1021/jm200906r
- ⑥ Tanino, Tetsuya; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda, Akira. Synthesis of L-*epi*-Capreomycin Derivatives via C-H amination. *Org. Lett.*, 2011, 13, 4028-4031. (査読有)
DOI: 10.1021/ol201527k
- ⑦ Furuita, Kyoko; Murata, Shunpei; Jee, Jun Goo; Ichikawa, Satoshi; Matsuda, Akira; Kojima, Chojiro.* Structural Feature of DNA Recognized by HMGB1. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 5788-5790. (査読有)
DOI: 10.1021/ja2013399
- ⑧ Sako, Yuki; Osada, Akiko; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda, Akira.* Synthesis and Evaluation of 5-Substituted 9-Hydroxypyrrolo[3,4-*c*]carbazole-1,3(2*H*, 6*H*)-diones as Check Point 1 Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 7878-7889. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bmc.2010.09.042
- ⑨ Sekiguchi, Hironori; Muranaka, Kazuhiro; Osada, Akiko; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda, Akira.* Efficient Synthesis of Hsp90 Inhibitor Dimers as Potential Antitumor Agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 7732-7737. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bmc.2010.05.075
- ⑩ Tanino, Tetsuya; Ichikawa, Satoshi*; Al-Dabbagh, Bayan; Bouhss, Ahmed; Matsuda, Akira.* Synthesis and Biological Evaluation of Muraymycin Analogues as Potential Anti-Drug-Resistant Bacterial. *ACS Med. Chem. Lett.* 2010, 1, 258-262. (査読有)
DOI: 10.1021/ml100057z
- ⑪ Ii, Kensuke; Ichikawa, Satoshi*; Al-Dabbagh, Bayan; Bouhss, Ahmed; Matsuda, Akira.* Function-oriented Synthesis of Simplified Caprazamycins: Discovery of Oxazolidine-containing Uridine Derivatives as Antibacterial Agents against Drug-resistant Bacteria. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 3793-3813. (査読有)
DOI: 10.1021/jm100243n
- ⑫ Kaysser, Leonard; Eitel, Kornelia; Tanino, Tetsuya; Siebenberg, Stefanie; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi; Gust, Bertolt.* A new ASST-type sulfotransferase involved in liponucleoside antibiotic biosynthesis in Streptomyces. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 12684-12694. (査読有)
DOI: 10.1074/jbc.M109.094490
- ⑬ Tanino, Tetsuya; Ichikawa, Satoshi*; Shiro, Motoo; Matsuda, Akira.* Total Synthesis of (-)-Muraymycin D2 and Its Epimer. *J. Org. Chem.* 2010, 75, 1366-1377. (査読有)
DOI: 10.1021/jo9027193
- [学会発表] (計 21 件)
- ① 中村 公祐、市川 聡、松田 彰、ムレイドマイシン類の全合成研究、日本薬学会第 133 年会 (ポスター発表)、2013 年 3 月、横浜、パシフィコ横浜
- ② 山口 繭美、伊井 謙介、市川 聡、松田 彰、天然物カプラザマイシン類をリードした新規抗菌薬の創製研究、第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム (ポスター発表)、2012 年 11 月、東京、船堀タワーホール
- ③ 千葉 拓也、市川 聡、松田 彰、シリゴリン A の合成研究、第 54 回天然有機化合物討論会 (ポスター発表)、2012 年 9 月、東京、東京農業大学
- ④ 市川 聡、天然物を用いる創薬化学：抗多剤耐性菌剤シーズの獲得を目指して、日本化学会生体機能関連化学部会第 27 回 若手フォーラム (招待講演)、2012 年 9 月、札幌、北海道大学
- ⑤ 千葉 拓也、市川 聡、松田 彰、プロテアソーム阻害剤シリゴリン A の合成研究、第 24 回万有札幌シンポジウム

- ム (ポスター発表)、2012年7月、札幌、北海道大学
- ⑥ 山口 繭美、市川 聡、松田 彰、分子内 1,3-双極子付加環化反応を機軸とした新規抗菌剤の開発研究、日本薬学会北海道支部例会第138例会 (口頭発表)、2012年6月、札幌、札幌コンベンションセンター
- ⑦ 片山 勝史、市川 聡、松田 彰、ジアステレオ選択的な Ugi 反応を用いたサンドラマイシンの全合成研究、日本薬学会第132年会 (口頭発表)、2012年3月、札幌、北海道大学
- ⑧ 千葉 拓也、市川 聡、松田 彰、プロテアソーム阻害活性を有するシルバクチン類の合成研究、日本薬学会第132年会 (口頭発表)、2012年3月、札幌、北海道大学
- ⑨ 山口 繭美、市川 聡、松田 彰、抗菌剤開発を指向したイソキサゾリジン環を有するウリジン誘導体の設計・合成、日本薬学会第132年会 (口頭発表)、2012年3月、札幌、北海道大学
- ⑩ 岡村 拓也、市川 聡、松田 彰、抗腫瘍活性天然物キナルドペプチンの構造活性相関研究、日本薬学会第132年会 (口頭発表、学生優秀発表賞)、2012年3月、札幌、北海道大学
- ⑪ 千葉 拓也、市川 聡、松田 彰、プロテアソーム阻害活性を有するシルバクチン類の合成研究、日本薬学会北海道支部例会第137例会 (口頭発表、学生優秀発表賞)、2011年12月、札幌、札幌コンベンションセンター
- ⑫ Ichikawa, S.; Matsuda, A.、Development of Antibacterial Agents Active against Drug Resistant Bacteria Based on Natural Products、AIMECS11 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium “Frontier of Medicinal Science” 2011 (Oral Presentation), Nov. 2011, Tokyo, Japan, Keio Plaza Hotel
- ⑬ Lee, S.-H.; Ichikawa, S.; Matsuda, A.、Synthesis and Biological Evaluation of Caprazamycin Analogues、AIMECS11 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium “Frontier of Medicinal Science” 2011 (Poster Presentation), Nov. 2011, Tokyo, Japan, Keio Plaza Hotel
- ⑭ Okamoto, K.; Sakagami, M.; Feng, F.; Togame, H.; Takemoto, H.; Ichikawa, S.; Matsuda, A.、Total Synthesis of Pacidamycin D by Cu^(I)-Catalyzed Oxyenamide Formation、AIMECS11 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium “Frontier of Medicinal Science” 2011 (Poster Presentation), Nov. 2011, Tokyo, Japan, Keio Plaza Hotel
- ⑮ 片山 勝史、市川 聡、松田 彰、抗腫瘍活性環状ペプチドサンドラマイシンの合成研究、第53回天然有機化合物討論会 (ポスター発表)、2011年9月、大阪、大阪国際センター
- ⑯ 片山 勝史、市川 聡、松田 彰、サンドラマイシン誘導体の合成研究、第23回万有札幌シンポジウム (ポスター発表)、2011年7月、札幌、北海道大学
- ⑰ 村中 一大、市川 聡、松田 彰、新規カルボキサミド保護基 4-(*tert*-butyldimethylsiloxy)-2-methoxybenzyl (SiMB) 基の開発と環化促進補助基としての応用、第9回次世代を担う有機化学シンポジウム (口頭発表)、2011年5月、東京、日本薬学会長井記念ホール
- ⑱ 稲垣 千尋、市川 聡、松田 彰、Ugi 反応を用いた 4'-(*R*)-dihydropacidamycin D の収束的完全合成研究、日本薬学会第131年会 (誌上発表)、2011年3月、静岡、ツインメッセ静岡
- ⑲ Tanino, T.; Ichikawa, S.; Matsuda, A.、Comprehensive synthetic study of muraymycins toward the development of novel antibiotics、The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies - Pacificchem 2010 (Poster Presentation), Dec. 2010, Honolulu, Hawaii, Hawaii Convention Center, U.S.A.
- ⑳ Ichikawa, S.; Ii, K.; Matsuda, A.、Function-oriented synthesis of caprazamycins as antibacterial agents active against drug-resistant bacteria、

IRT 2010-XIX International Round
Table on Nucleosides, Nucleotides
and Nucleic Acids (Oral
Presentation), Aug. 2010, Lyon,
France, Universite Claude Bernard
Lyon

- ⑫ 谷野 哲也、市川 聡、魚谷 幸一、松
田 彰、抗菌抗生物質ムライマイシンの
脂質部誘導体の構造活性相関研究、日本
薬学会北海道支部例会第134例会(口頭
発表、学生優秀発表賞)、2010年5月、
札幌、札幌コンベンションセンター

[その他]

ホームページ等

http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakka/Matsuda_Lab/Matsuda_Lab_Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 聡 (ICHIKAWA SATOSHI)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：60333621

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし