

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31日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890202

研究課題名（和文）Bottromycin A2のコンビナトリアル合成と新規抗MRSA
活性薬の創製研究課題名（英文）Combinatorial Synthesis of Bottromycin A2 and Development of New Anti
MRSA Agent

研究代表者

山田 健（YAMADA TAKESHI）

北里大学・大学院感染制御科学府・助教

研究者番号：00608367

研究成果の概要（和文）：実用的な新規抗生物質の創製を目的に、毒性が低く、薬剤耐性菌に対して強力な抗菌活性を有するボトロマイシンの効率的な合成法の確立と、構造活性相関研究に着手した。その結果、幅広い類縁体合成を見据えた収束的経路により、ボトロマイシン類縁体を合成できた。また、ボトロマイシンに含まれる異常アミノ酸の抗菌活性に与える影響を調査し、さらにボトロマイシンの三次元構造を明らかとするなど、今後の薬剤開発に大きな知見を得ることが出来た。

研究成果の概要（英文）：We have developed the convergent synthetic route to bottromycins (BTMs), which exhibit a potent antibiotic activity against MRSA and VRE with novel mode of action. In the course of SAR study, we found the methyl groups of unnatural amino acids, 3-Me-Pro and 3-Me-Phe, are the important functionality for their biological activities. The three-dimensional structure of BTM was investigated to improve understanding of SAR, and to design the new BTM analog which reveals the potent antibiotic activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：有機合成化学

科研費の分科・細目：化学系薬学

キーワード：ボトロマイシン、ペプチド合成、アミジン、抗MRSA、抗VRE

1. 研究開始当初の背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に代表される薬剤耐性菌の出現が大きな問題

となっている。MRSAは院内感染症の主要原因菌であり、一旦感染すると既存の抗菌薬による除菌が容易でなく、重篤な基礎疾患を有す

る患者が感染した場合、日和見感染を起こして死に至ることがある。

近年、北里研究所天然物ライブラリーより、Bottromycin A₂ (BTMA₂) の顕著な抗 MRSA、抗 VRE (バンコマイシン耐性腸球菌) 活性が見出された。BTMA₂ は、12 員環ペプチド内に存在するアミジン基に側鎖トリペプチドが連結した独特な骨格を有し、それを構成する7つのアミノ酸のうち5つが異常アミノ酸という特異かつ複雑な構造を持つ (Figure 1)。BTMA₂ は、毒性が低く、新規な作用機序で MRSA や VRE を始めとする様々な病原菌に対して強い抗菌活性を示すため (MIC < 2 μg/mL)、次世代の抗生物質として有力である。しかし、BTMA₂ そのものを臨床薬として利用するには、水溶性、血中安定性、および構造の複雑さに起因する量的供給に課題がある。

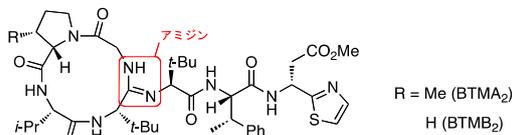


Figure 1: Bottromycin (BTM)

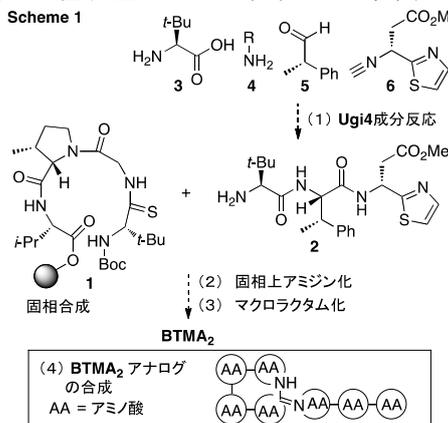
我々の研究グループでは、アミジン構築と12員環マクロラクタム化を鍵に既に BTMA₂ の初の全合成を報告している。本合成は、液相反応条件下アミノ酸ユニットを一つずつ連結する経路を取っており、工程数が多く、総収率は低く、活性試験に必要な十分量の誘導体の確保、幅広い類縁体の合成が容易ではなかった。

2. 研究の目的

毒性が低く、新規な作用機序で、顕著な抗 MRSA、抗 VRE 活性を示す BTMA₂ をリードに、有機合成的アプローチから新規抗菌薬の創製を目的とした。

3. 研究の方法

上記目的を達成するため、BTMA₂ の効率的固相合成法の確立 (1) 触媒的不斉 Ugi 反応による BTMA₂ 側鎖トリペプチドの立体選択的合成、(2) 固相上アミジン化、(3) 12 員環マク



ロラクタム化)、および(4)BTMA₂の構造活性相関研究を計画した (Scheme 1)。

(1) 触媒的不斉 Ugi 反応による BTMA₂ 側鎖トリペプチドの合成

Ugi 反応は、カルボン酸、アミン、アルデヒド、イソシアニドを一挙に連結させる代表的なコンビナトリアル合成法である。BTMA₂ アナログの合成を視野に入れ、本反応による BTM 類の側鎖トリペプチドの合成を計画した。

(2) 固相上アミジン化

アミジンは、チオアミドとアミンを Hg(OTf)₂ で処理することにより構築できることを先の液相全合成の際に明らかにしている。その知見を基に、固相に担持させたチオアミド **1** とアミン **2** を硫黄原子と親和性のあるルイス酸で処理することによりアミジンを構築出来ると考えた。

(3) 12 員環マクロラクタム化による BTM 類の合成

12 員環マクロラクタム化は、A~C の位置での環化が可能である (Figure 2)。A および B の位置でのマクロラクタム化は、アミジン基と5員環化あるいは6員環化した副生成物が得られることが分かっている。一方、C の位置でのマクロラクタム化は、環化しやすい位置に NH が存在しないため、効果的に望む12員環化生成物が得られると期待した。

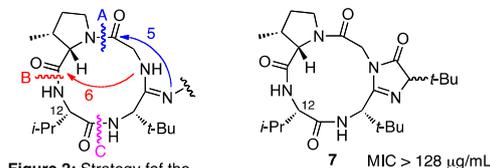


Figure 2: Strategy for the macrolactamization

Figure 3

(4) BTMA₂ 類縁体の幅広い構造活性相関研究

① BTM 類の三次元構造解析

¹H NMR において、BTMA₂ の12位水素は、著しく低磁場にシフト (2.36 ppm, in CDCl₃) しており、また、側鎖トリペプチド **2**、あるいは12員環部を有するイミダゾロン **7** (Figure 3) だけでは抗菌活性を示さないことから、後のアナログ設計のため、BTMA₂ の三次元構造を、分子動学的計算を用いて解析した。

② BTM アナログの合成と抗菌活性評価

MRSA や VRE に対して強力な抗菌活性を有する BTMA₂ は、構成する7つのアミノ酸のうち、5つが異常アミノ酸である。そこで、構造を簡素化する目的で、異常アミノ酸の生物活性に与える影響を調査した。既に報告した BTMA₂ の全合成経路により、3-メチルプロリンと3-メチルフェニルアラニンをそれぞれ対応する天然アミノ酸に改変したアナログを

合成し、その生物活性を評価した。なお、プロリンが組み込まれた BTMB₂ は、天然類縁体であり、未だ絶対立体配置が未決定である。

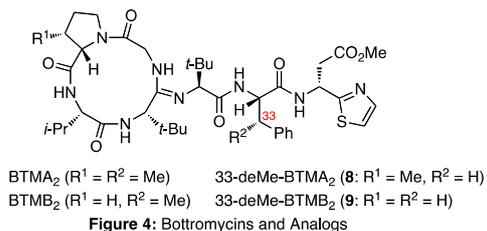
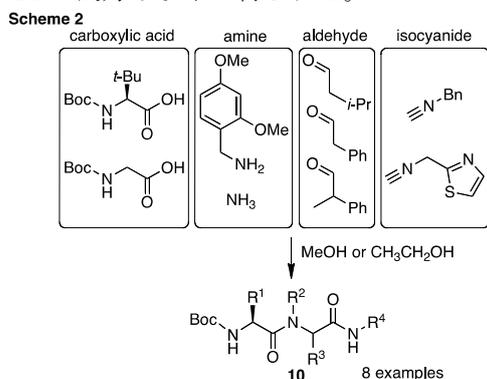


Figure 4: Bottromycins and Analogs

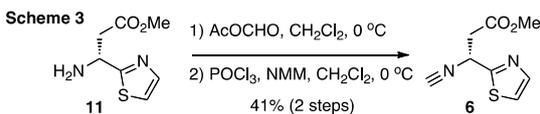
4. 研究成果

(1) 触媒的不斉 Ugi 反応による BTMA₂ 側鎖トリペプチドの合成

Scheme 2 に示す各種カルボン酸、アミン、アルデヒド、イソシアニドを用いて、Ugi 反応を試みた。その結果、メタノールあるいはトリフルオロエタノールを溶媒として用いることにより、それぞれ対応するトリペプチド **10** が良好な収率で得られた。



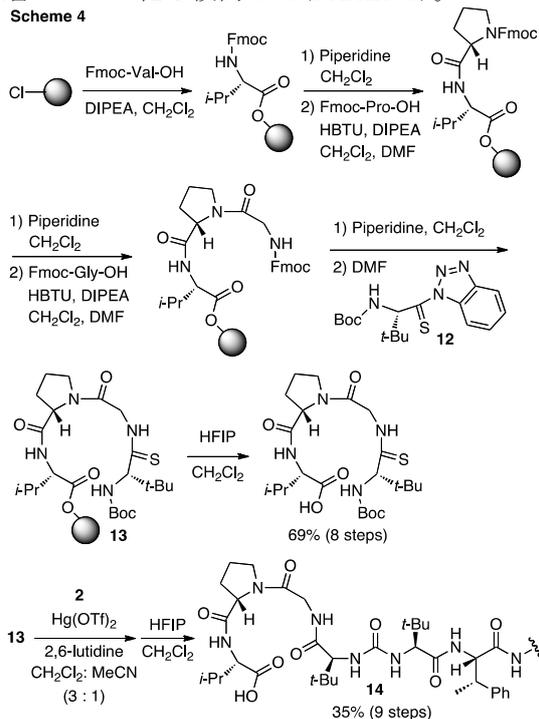
続いて、β-チアゾリルアラニンを含むトリペプチド **2** を合成するため、**11** からイソシアニド **6** への変換を検討した。β-チアゾリルアラニン **11** は、α位の酸性度が高く、ラセミ化を起こしやすい。そこで、ホルミル化と脱水反応において様々な条件を検討した結果、AcOCHO を用いてホルミル化した後、N-メチルモルホリン存在下、0°C で塩化ホスホリルを作用させることにより対応するイソシアニド **6** が光学純度を保持して得られることがわかった (**Scheme 3**)。このことより、BTM アナログの合成を視野に入れた、触媒的不斉 Ugi 反応への展開の足がかりが出来た。



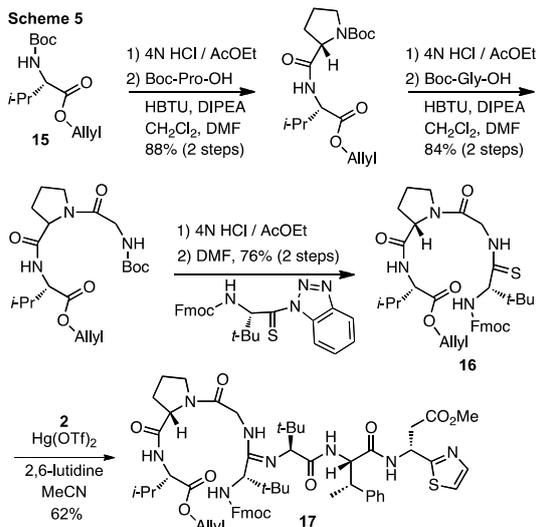
(2) 固相上アミジン化

2-クロロトリチルレジンをバリンを担持し、Fmoc 固相合成法により、順次プロリン、グリシン、チオアミド化した t-ロイシン **12** を縮合し、12 員環部に相当するテトラペプチド

ド **13** を 7 工程 69% 収率で合成した (**Scheme 4**)。続いて、別途調製した側鎖トリペプチド **2** とのアミジン化を検討した。先に確立したアミジン化条件を基に、MeCN と CH₂Cl₂ 混合溶媒中 (1 : 3)、2,6-ルチジン、トリペプチド **2** 存在下、Hg(OTf)₂ を作用させたところ、期待に反してアミジン体は得られず、ウレア体 **14** が主に得られた。本副反応は、Boc 由来の t-Bu カチオンを経由して進行していると想定し、N 末端の保護基を検討した。固相上では、反応のモニタリングが困難であるため、まず液層アミジン化を検討した (**Scheme 5**)。



バリン **15** から先と同様に順次アミノ酸を縮合し、N 末端保護基の異なるテトラペプチドを各種合成した。続いて様々な条件を検討

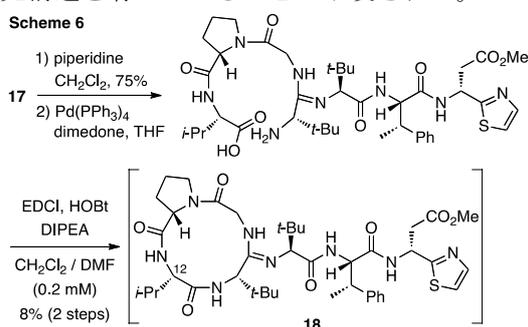


した結果、Fmoc 基を有するテトラペプチド

16 に対し、MeCN 中、2,6-ルチジン、トリペプチド **2** 存在下、Hg(OTf)₂ を作用させることで、中程度の収率で対応するアミジン体 **17** が得られた。Fmoc 基が本反応に適していたことから、固相合成への適用が期待される。

(3) 12 員環マクロラクタム化

得られたアミジン体 **17** の C 末端、N 末端保護基をそれぞれ除去し、EDCI を用いた縮合条件に付すことにより、望む 12 員環化体 **18** が得られた (Scheme 6)。BTMB₂ とデータが一致しなかったが、各種 NMR スペクトル解析より、平面構造は BTMB₂ と同じであることが示唆された。また **18** は、BTM 類特有の ¹H NMR における 12 位の低磁場シフトが確認できなかったことから、天然 BTM 類とは異なる三次元構造を有していることが示唆された。



BTM と同様の骨格を有するアナログを合成出来たことから、BTM 類の固相合成の土台を築くことが出来た。

(4) BTMA₂ 類縁体の構造活性相関研究

① BTM 類の三次元構造解析

BTMA₂ の NMR 解析から得た水素間距離と二面角拘束条件を基に (CNS 法)、BTMA₂ の三次元構造を解析した (Figure 5)。その結果、BTMA₂ は、アミジンの両端に存在する嵩高い *t*-Bu 基が立体反発を受け、それぞれが逆側に存在し、その結果、12 員環部に側鎖トリペプチドが覆い被さる折りたたみ三次元構造を有することが明らかとなった。そのため、12 位の水素はチアゾールの遮蔽効果を受け、¹H NMR において低磁場に大きくシフトしていることが分かった。

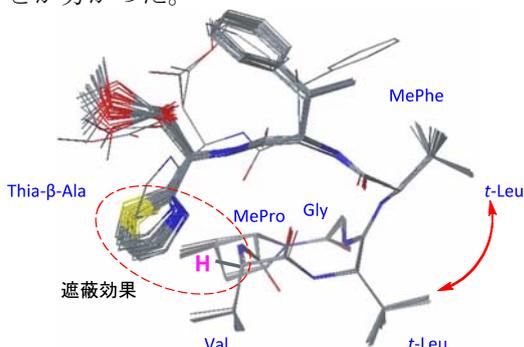
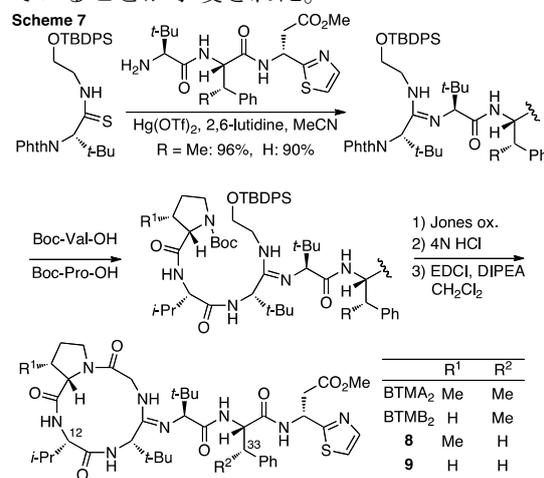


Figure 5: BTMA₂ の溶液中三次元構造

② BTM アナログの合成と抗菌活性評価

既に報告した合成経路により、天然類縁体である BTMB₂ を含む BTM アナログ **8, 9** を合成し、不明であった BTMB₂ の絶対立体配置を明らかにした (Scheme 7)。BTMB₂ に加え、アナログ **8, 9** は、¹H NMR スペクトルにおいて、12 位水素の低磁場シフトが観測されたため、BTMA₂ と同様の折りたたみ三次元構造を有していることが示唆された。



これら BTM 類の抗菌活性を評価した結果、メチル基が欠損したアナログは、抗菌活性の低下を引き起こした (Table 1)。特に 33 位メチル基は、抗菌活性発現に重要であった。さらに、BTM と三次元構造の異なるアナログ **18** が抗菌活性を示さないことから、BTM の折りたたみ三次元構造が活性発現に必須であることがわかった。

Table 1: 抗菌活性評価 (MIC)

Strain	VCM	LZD	BTMA ₂	BTMB ₂	8	9	18
SA	1	2	0.5	4	32	>32	>32
MRSA	1	2	1	4	>32	>32	>32
VRE	>256	2	0.25	2	16	>32	>32

SA: Staphylococcus aureus, VCM: Vancomycin, LZD: Linezolid

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 4 件)

- ① 山田 健、βラクタムの Dyotropic 転位を利用した天然物合成、有機合成化学協会誌、2013 年、8 月号掲載予定。(査読有)
- ② Yoko Yasuno, Makoto Hamada, Takeshi Yamada, Tetsuro Shinada, Yasufumi Ohfuné. Stereoselective synthesis of *E*-α · β-dehydroamino acid esters, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1884–1888. (査読有), DOI: 10.1002/ejoc.201300112
- ③ Takeshi Yamada, Keiji Okada, Tetsuro Shinada, Yasufumi Ohfuné, Hideki Hashimoto Efficient synthesis of anhydrorhodo- vibrin and analogues, *Synlett* **2012**, 23, 2980–2984. (査読有),

DOI: 10.1055/ s-0032-1317678

- ④ Hiroaki Gouda, Yutaka Kobayashi, Takeshi Yamada, Tetsuya Ideguchi, Akihiro Sugawara, Tomoyasu Hirose, Satoshi Omura, Toshiaki Sunazuka, Shuichi Hirono, Three dimensional solution structure of bottromycin A2: a potent antibiotic active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-resistant Enterococci, *Chem. Pharm. Bull.* **2012**, *60*, 169-171. (査 読 有)
DOI:10.1248/cpb.60.169

[学会発表] (計20件)

- ① 山田 健, 小林 豊, 千成 恒, 井手口哲也, 廣瀬友靖, 合田浩明, 広野修一, 大村 智, 砂塚敏明、抗 MRSA, VRE 活性を有する Bottromycin 類の効率的全合成研究、日本薬学会第 133 年会、講演番号 30pmA-518、パシフィコ横浜, 2013 年 3 月 30 日
- ② 山田 健、抗 MRSA, VRE 活性を有する Bottromycin 類の合成、有機化学セミナー (2013) プログラム, 大阪市立大学, 2013 年 3 月 9 日。(招待講演)
- ③ 山田 健、インドリンスピロアミナル骨格を有するネオキサリンの全合成、若手研究者セミナー, 東京理科大学, 神楽坂キャンパス 2012 年 11 月 16 日。(招待講演)
- ④ 小林 豊, 市岡真季, 廣瀬友靖, 山田 健, 長井賢一郎, 合田浩明, 島村寛章, 花木秀明, 広野修一, 大村 智, 砂塚敏明、Bottromycin A₂ の全合成と誘導体合成研究、第 15 回北里微生物アカデミー研究集会、講演要旨集 p-67, 演題番号 4, 北里大学白金キャンパス, 2012 年 8 月 2 日。
- ⑤ 小林 豊, 市岡真季, 廣瀬友靖, 山田 健, 長井賢一郎, 合田浩明, 島村寛章, 花木秀明, 広野修一, 大村 智, 砂塚敏明、Bottromycin A₂ の全合成と誘導体合成研究、第 10 回次世代を担う有機化学シンポジウム, 2-07, 大阪大学吹田キャンパス, 2012 年 5 月 12 日。
- ⑥ 小林 豊, 山田 健, 井手口哲也, 千成 恒, 廣瀬友靖, 小林義典, 合田浩明, 広野修一, 大村 智, 砂塚敏明、抗 MRSA 活性物質 Bottromycin 類の固相合成研究、日本薬学会第 132 年会, 講演要旨集 31E03-pm10S, 北海道大学, 2012 年 3 月 31 日。
- ⑦ 合田浩明, 小林 豊, 山田 健, 井手口哲也, 菅原章公, 廣瀬友靖, 大村 智, 砂塚敏明, 広野修一、抗 MRSA および抗 VRE 活性を有する天然化合物 bottromycin A2 の溶液構造決定、日本薬学会第 132 年会, 講演要旨集 30E10-pm08, 北海道大学, 2012 年 3 月 30 日。
- ⑧ 山田 健, 井手口哲也, 千成 恒, 小林 豊,

廣瀬友靖, 松井秀仁, 花木秀明, 合田浩明, 小林義典, 広野修一, 大村 智, 砂塚敏明、Bottromycin A₂ を模倣した新規抗 MRSA 活性物質の創製、AKPS 集会 第 7 回北里化学シンポジウム, 講演要旨集 p-44, 北里大学白金キャンパス, 2011 年 12 月 22 日。

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-lab22.html>

<http://seibutuyuuki.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健 (YAMADA TAKESHI)

北里大学・大学院感染制御科学府・助教

研究者番号：00608367