



Title	ペプチドスキャンニング法とin situスクリーニング法の併用によるポリミキシンBの活性改変 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	家口, 凜太郎
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第15311号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89498
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Rintaro_Kaguchi_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学）氏名 家口 凜太郎

審査担当者	主査	教授	市川 聡
	副査	教授	脇本 敏幸
	副査	准教授	薬師 寺文華
	副査	講師	松田 研一

学位論文題名

ペプチドスキニング法と *in situ* スクリーニング法の併用による
ポリミキシン B の活性改変

博士学位論文審査等の結果について（報告）

ペプチドは、低分子医薬品よりも分子表面積が大きく官能基も豊富に有することから、低分子医薬品ではアクセス困難な標的とも相互作用することができる。これを構成する一部のアミノ酸残基に対し、適切な置換基を導入すると、高活性誘導体やケミカルツールを創製することができる。このような置換基の導入位置を系統的に探索する手法として、ペプチドスキニング法が知られている。例えばアラニンスキニングでは、ペプチドの各アミノ酸残基をアラニンに置換することで、標的分子との相互作用に関与していないアミノ酸側鎖を同定できる。この結果を踏まえて誘導体を合成するにあたっては、スキニングで使用したアラニン置換体のメチル基の部分に、直接置換基を導入するのが理想である。しかしながら、メチル基は化学的に不活性であるため、適切な置換基が導入された誘導体を一から合成し直す必要があるのが現状である。そこで家口氏は、スキニングに使用する誘導体を、スキニングだけでなく、更なる誘導展開の起点として用いるという着想から、以下に述べるペプチドの新規構造最適化法を立案した。まず、スレオニンを置換基として有するアミノ酸をスキニング単位として用いることで、ペプチドの主鎖や側鎖に於ける置換基の導入許容性をスキニングする。次に、置換基の導入が可能と判断されたスキニング誘導体が有する、スレオニンのアミノ基に対し、セリン/スレオニンライゲーション (STL) による化学選択的なアシル化を行うことで、誘導体合成へと展開する。以上の二つの工程により、親ペプチドのスキニングと、引き続き誘導体合成とをシームレスに遂行可能である。家口氏は、この創薬手法を抗菌薬ポリミキシン B に適用し、細菌感染症治療の至上命題である「ポリミキシン耐性大腸菌に有効な誘導体の創製研究」と、「狭域・広域スペクトルを示す誘導体の創製研究」の二つを遂行した。

家口氏はまず二つの研究の実施にあたり、ポリミキシン B の各アミノ酸残基をスレオニルジアミノブタン酸に置換した誘導体と、側鎖部を短縮し、N 末端にスレオニンを導入した誘導体からなる、12 個のスキニング誘導体を設計した。これらを合成すべく、ペプチド固相合成法によって鎖状保護ペプチドを得たのち、Dab⁴ の側鎖のアミノ基と Thr¹⁰ のカルボン酸との縮合によるマクロ環化を行った。その結果、望みの環化体は得られる一方で、Thr¹⁰ の α 位でエピメリ化が進行した化合物が主生成物として得られた。同様の結果は、先に設計した 12 個の誘導体のうち、11 個の合成で認められた。そこで、反応条件のハイスループットスクリーニングにより、各スキニング誘導体の環化条件を一挙に検討した。12 個の環化前駆体をそれぞれ 8 つの反応条件に附すことで、計 96 個の反応条件を一挙に検討したところ、各スキニング誘導体の環化に最適な条件が見出された。それらを用いたところ、12 個の誘導体を首尾よく得ることができた。

続いて家口氏は、得られたスキニング誘導体を用いて、「ポリミキシン耐性大腸菌に有効な誘導体の創製研究」を実施した。はじめに、ポリミキシン耐性大腸菌に対する、ポリミキシン B のスキニングを行ったところ、Dab¹、Thr²、Dab³、Dab⁸、Dab⁹、Thr¹⁰ をスレオニルジアミノブタン酸に置換した 6 つの誘導体が、ポリミキシン B よりも 8 倍以上弱いながらも抗菌活性を示した。そこで、このうち 3 つのスキニング誘導体から誘導展開を行うことで、活性化化合物を探索することとした。また、Dab⁵、D-Phe⁶、Leu⁷ をスレオニルジアミノブタン酸に置換した 3 つの誘導体が、評価濃度内で抗菌活性を示さなかったことを踏まえ、対照実験としてこれらからも同様に誘導展開を行うこととした。次に、極小 (200 nmol) スケールでの STL を検討したところ、二つの原料 [アミノアルコールを持つスキニング誘導体とサリチルアルデヒド (SAL) エステル] を混合するのみで、スレオニンのアミノ基に選択的にアシル化が進行した化合物が収率 70%で得られた。スキニング誘導体が有する複数のアミノ基は本反応に干渉せず、副生成物も与えなかった。以上のことから、誘導体合成に *in situ* スクリーニング法を併用することを着想した。これは、反応成績体を精製せず、直接活性評価に供するものである。そこで、54 個の SAL エステルを合成し、前述の 6 つのスキニング誘導体に対する STL に供した。得られた 324 個の誘導体のうち 238 個

(73.5%)は、50%以上の UV 純度を有していた。次にこれらを、ポリミキシン耐性大腸菌に対する抗菌活性のスクリーニングに供したところ、前述のスキヤニングで活性を示した 3 つのスキヤニング誘導体から、ポリミキシン B と同濃度で抗菌活性を示す誘導体が十数個見出された。一方で、スキヤニングで活性を示さなかった 3 つのスキヤニング誘導体からは、同濃度で有効な誘導体は 2 つしか得られなかったことから、前述のスキヤニングが期待通りに機能していることがわかった。更に、スクリーニングのヒット化合物の純品を合成・評価したところ、ポリミキシン耐性大腸菌に対し、天然物ポリミキシン B と同等以上の抗菌活性を示すことがわかった。分子動力学シミュレーションの結果から、この活性誘導体が結合標的である膜脂質リポド A に結合する前後で、開いた配座と閉じた配座をとることが、抗菌活性に有益に寄与していることが示唆された。

次に家口氏は、「狭域・広域スペクトルを示す誘導体の創製研究」を実施した。先に述べた 12 個のスキヤニング誘導体について、ESKAPE 病原体 9 菌種に対する抗菌活性を評価したところ、緑膿菌にのみ抗菌活性を示し、その他 8 つの細菌には評価濃度内で抗菌活性を示さないスキヤニング誘導体が見出された。そこで、このスキヤニング誘導体に対して STL による誘導展開を行ったのち、抗菌活性のスクリーニングに供したところ、緑膿菌に選択的な抗菌活性を示す誘導体が見出された。また、同様にスキヤニングと誘導展開を行うことで、ポリミキシン B が抗菌活性を示さないグラム陽性菌や、ポリミキシン耐性大腸菌に対しても抗菌活性を示す、広域スペクトル誘導体が見出された。

最後に、スレオニルジアミノブタン酸を用いたスキヤニングの性質を考察した。アラニンスキヤニングとの比較から、スキヤニングに際してアミノ酸側鎖に嵩高い置換基を導入するか、側鎖を欠損させるかという違いが、両者の結果に差異を与えることが示唆された。この差異を念頭に、アラニンスキヤニングでは“必須”と判断されたアミノ酸残基に置換基の導入を行ったところ、抗菌活性を示す誘導体を獲得するに至った。このことから、スレオニルジアミノブタン酸を用いたスキヤニングでは、嵩高い置換基や極性置換基の導入可否を検討できるものと考えられる。

以上、本研究では、スレオニン有するスキヤニング誘導体を用いた、ペプチドの新規構造最適化法を開発した。これは、スキヤニングによって嵩高い置換基や極性置換基の導入位置を決定したのち、スキヤニング誘導体から直接誘導展開を行うことで、活性化化合物を探索するものである。また、誘導展開に *in situ* スクリーニング法を併用することで、最適な置換基を迅速に決定することが可能である。本手法は、ペプチド配列のスキヤニングと構造最適化のための一般的な手法として、広く応用できるものと考えられる。

これを要するに、家口氏の研究業績は、ペプチド化学において、スキヤニングに使用する誘導体を、スキヤニングだけでなく、更なる誘導展開の起点として用いるという着想から、新規構造最適化法を立案し、本手法を抗菌薬ポリミキシン B に適用し、ポリミキシン耐性大腸菌に有効な誘導体の創製研究と、狭域・広域スペクトルを示す誘導体の創製を遂行した。本研究は、ペプチド創薬化学に対して大きな貢献をするものである。よって家口氏は、北海道大学博士(薬科学)の学位を授与される資格あるものと認める。