HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	プラスバシンA3の全合成と作用機序解明に向けた研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	勝山, 彬
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13173号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69953
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akira_Katsuyama_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　氏　名　　勝山　彬

学 位 論 文 題 名

プラスバシン A_3 の全合成と作用機序解明に向けた研究

近年、薬剤耐性菌の出現により、既存の抗菌薬による感染症治療が困難になりつつあり、新規抗菌薬の開発は急務である。新規抗菌薬を開発するうえで、薬剤耐性が生じにくい性質が重要であると考えられる。申請者は抗菌薬のリード化合物として、細菌のペプチドグリカン生合成の前駆体である lipid II に結合し、抗菌活性を示すペプチド系天然物、プラスバシン A_3 に着目した。プラスバシン A_3 は 2 つの *trans*-3-ヒドロキシプロリン[Pro(3-OH)]を含む、5 つの非天然アミノ酸を有する 28 員環ノナデプシペプチドであり、lipid II に結合することでペプチドグリカンの生合成を阻害する。現在臨床使用されているバンコマイシンは、Lipid II に結合することで抗菌活性を示し、薬剤耐性を生じにくい性質を有する。従って、プラスバシン A_3 もバンコマイシン同様薬剤耐性に抵抗性を示すと予想される。一方。プラスバシン A_3 はバンコマイシン耐性菌に対しても抗菌活性を示すことから、作用機序はバンコマイシンとは異なると考えられているが、詳細は明らかになっていなかった。申請者は以上の背景のもと、プラスバシン A_3 の作用機序解明を目的として、プラスバシン A_3 の全合成と、lipid II との相互作用に関する研究を行った。

プラスバシン A_3 の全合成は VanNieuwenhze らによって達成されているが、高価かつ合成に多工程を要する Pro(3-OH)を出発物質として用いているため、誘導体合成への展開が困難であった。申請者は Pro(3-OH)の構築とペプチド鎖の伸長を一段階で行える、Joullié-Ugi 三成分反応(JU-3CR)を鍵反応として選択し、反応のジアステレオ選択性に関して検討を行った。α位にトリイソプロピルシロキシ基を有する五員環イミンを用いて JU-3CR を行ったところ、反応溶媒によりジアステレオ選択性が変化し、トルエン中では *trans*/*cis* = 15/85、ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)中では *trans*/*cis* = 82/18 のジアステレオ選択性が得られた。HFIP 中での *trans* 選択性はイソシアニドの電子の増大に伴い上昇し、*p*-ニトロフェニルイソシアニドを用いると *trans*/*cis* = 17/83、*p*-メトキシフェニルイソシアニドを用いると *trans*/*cis* = 60/40 の選択性が発現した。本反応に対する Hammett 解析の結果、トルエン中では接触イオン対に対するイソシアニドの付加を経て反応が *cis* 選択的に進行し、HFIP 中ではこの機構に加えて溶媒介在イオン対に対するイソシアニドの付加が起こる機構が協奏し、この際反応が *trans* 選択的に進行することで、上述のようなジアステレオ選択性の変化が起こったものと考えられる。

次に、JU-3CR を鍵反応として用い、プラスバシン A_3 の全合成を行った。プラスバシン A_3 の 28 員環構造はマクロラクトン化により構築することを計画した。JU-3CR を 2 回用いることで 2 つの Pro(3-OH)セグメントを合成し、環化前駆体のヒドロキシカルボン酸を合成した。この化合物に対して種々のマクロラクトン化条件を検討したが、望みの環化体を得ることはできなかったため、合成経路を変更し、28 員環の構築は D-Ser と D-β-ヒドロキシ-Asp 間でのマクロラクタム化により構築することとした。環化前駆体は 2 つの *C* 末端 Pro(3-OH)セグメントを含む 4 つのセグメントから合成することを計画し、*C* 末端 Pro(3-OH)セグメントの合成にはコンバーチブルイソシアニドを基質とした JU-3CR を用いることとした。電子豊富な第三級アルキル基を有するコンバーチブルイソシアニドを用いて JU-3CR を行い、得られた JU-3CR 成績体を *t*-ブトキシカリウムで処理することで、*N*-アシルオキサゾリジノンへと導いた。これを水酸化リチウムを用いて加水分解することで、カルボン酸へと変換し、2 つの Pro(3-OH)セグメントを合成した。合成した 4 つのセグメントをアミド縮合により連結し、マクロラクタム化を行うことで、プラスバシン A_3 保護体を、3 工程収率 48%で得た。最後に、得られた保護体をアニソール存在下、無水フッ化水素で処理することで、全ての保護基を除去し、プラスバシン A_3 を収率 76%で得た。合成品と天然物の NMR スペクトルおよび、逆相 HPLC 分析での保持時間は良い一致を示し、プラスバシン A_3 の全合成を達成した。また、同様の合成経路を利用して、プラスバシン A_3 の 2 つのβ-

ヒドロキシ-Asp 残基を Asp 残基へ変換した、ジデオキシ誘導体も合成した。

合成したプラスバシン A_3 とジデオキシ誘導体の抗菌活性を測定したところ、天然物は MRSA や MSSA に対して抗菌活性を示したのに対し、ジデオキシ誘導体は全く抗菌活性を示さなかった。両者 CD スペクトルの測定から、その三次元構造が異なることが明らかとなり、β-ヒドロキシ-Asp 残基の水酸基は標的分子である lipid II との結合に直接関与するのではなく、分子内水素結合により、環状ペプチドの構造を活性配座に保つ役割を担っていることが示唆された。また、プラスバシン A_3 はバンコマイシンに匹敵する薬剤耐性抵抗性を有していることも明らかとし、この際得られた、プラスバシン A_3 耐性株に対するゲノムシークエンス解析の結果から、プラスバシン A_3 の標的分子が lipid II であることが示唆された。

次に、プラスバシン A_3 と lipid II の結合親和性を調べることし、lipid II のウンデカプレニル基をより短いネリル基で摸倣した neryl-lipid II を固相法により合成した。ポリエチレングリコール担持型ヒドロキシメチル安息香酸樹脂を固相担体として用い、アミド縮合による、固相上での糖ペプチドの合成と、トリアゾリウムトリフラートを活性化剤としたジリン酸化を行い、塩基性水溶液による脱保護と脱樹脂を行うことで neryl-lipid II の固相全合成を総収率 21%で達成した。また、lipid II 以外の細胞壁生合成前駆体である lipid I のネリル誘導体と Park ヌクレオチドの合成も達成し、これら三種類の化合物の Lys 残基アミノ基に蛍光修飾を施した蛍光標識体も合成した。

合成したプラスバシン A_3 と neryl-lipid II の結合親和性を等温滴定カロリメトリー(ITC)により測定した。その結果、プラスバシン A_3 と neryl-lipid II の結合は観測されなかった。一方、脂質二重膜からなるリポソームのゼータ電位はプラスバシン A_3 の濃度依存的に減少したことから、プラスバシン A_3 は溶液中で lipid II と相互作用するのではなく、先に細胞膜上に挿入した後に、lipid II と結合する可能性が示唆された。次に、この一連のイベントに関する知見を得るべく、分子動力学シミュレーションを実施した。その結果、プラスバシン A_3 は脂質二重膜に挿入し、それに伴い分子内水素結合の様式が変化することで、分子全体の配座が変化することが明らかとなった。また、解析の結果、2 つのβ-ヒドロキシ-Asp 残基の水酸基同士の水素結合の出現頻度が大きく変化することがわかった。以上の結果より、プラスバシン A_3 は細胞膜に挿入した後に、2 つのβ-ヒドロキシ-Asp 残基の水酸基同士の水素結合が形成されることで、lipid II に結合する活性配座をとり、lipid II に結合することで、ペプチドグリカンの生合成を阻害する可能性が示唆された。

以上、申請者は JU-3CR のジアステレオ選択性が反応溶媒により変化することを見出し、本反応を鍵反応としてプラスバシン A_3 とそのジデオキシ誘導体の全合成を達成した。プラスバシン A_3 が薬剤耐性を生じにくい性質を有していることを明らかにし、抗菌活性の発現には、β-ヒドロキシ-Asp 残基の水酸基が重要であることを見出した。固相合成法により合成した neryl-lipid II とプラスバシン A_3 の結合親和性評価、プラスバシン A_3 とリポソームの相互作用解析、分子動力学シミュレーションの結果から、プラスバシン A_3 は細胞膜に挿入した後に配座変化を起こし、lipid II と結合する作用機序で抗菌活性を示していることが示唆された。