



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	MraY阻害天然物を基盤とした新規抗薬剤耐性菌薬リードの開発研究 [全文の要約]
Author(s)	山本, 一貴
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：薬学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第14403号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81883
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_Yamamoto_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏 名 山本 一貴

学 位 論 文 題 名

MraY 阻害天然物を基盤とした新規抗薬剤耐性菌薬リードの開発研究

近年、世界的に薬剤耐性菌が蔓延しており、既存のあらゆる抗菌薬が効かない多剤耐性菌は、公衆衛生上深刻な問題である。細菌細胞壁のペプチドグリカン、ヒト細胞が有していない成分であり、その生合成阻害は、細菌選択的に作用し、毒性の少ない抗菌薬を開発するうえで重要なターゲットの一つである。MraY は、ペプチドグリカン生合成経路における最初の反応を触媒する膜貫通酵素であり、細菌に普遍的に存在し、その欠損は細菌にとって致死的である。また、既存の抗菌薬とは異なるターゲットであるため、MraY 阻害剤は、薬剤耐性菌にも効果のある新規抗菌薬として期待される。MraY 阻害剤としては、ヌクレオシド系天然物であるムライマイシン、カプラザマイシン・リポシドマイシン、カプラマイシン、ツニカマイシン、ムレイドマイシン等が知られ、ウリジンを共通構造として有しながら、多様な構造からなるアクセサリーモチーフがそれぞれの生物活性を特徴づけている。筆者は、これら MraY 阻害天然物を基盤として、薬剤耐性菌にも効果のある新規抗菌薬を開発することを目的とした。当研究室では、ムライマイシン、カプラザマイシンの構造活性相関研究を行ってきたが、筆者は、構造活性相関の情報がほとんどないツニカマイシンに着目し、研究に着手した。

ツニカマイシンは、ウリジンと D-ガラクトサミンが C-C 結合で連結したツニカミニルウラシルに、N-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)が 11 β ,1 α -トレハロース型グリコシド結合で連結し、さらにガラクトサミン部に長鎖脂溶性アシル基が結合した構造を有する。ツニカマイシンは、MraY を阻害することで抗菌活性を示す一方で、MraY と同じスーパーファミリーに属するヒトの GPT を阻害することで、殺細胞活性を示すことから、抗菌薬として開発するには、MraY 阻害活性・抗菌活性の向上と副作用の原因となる GPT 阻害の減弱が課題となる。筆者は、これらの課題を解決するには、ツニカマイシンの化学構造改変による構造活性相関が必要であると考え、1) 構造活性相関研究を指向したツニカマイシン V の全合成法の開発、2) 側鎖部、GlcNAc 部に関する構造活性相関研究に取り組んだ。また、3) ビルドアップライブラリー合成戦略に基づく、天然物を基盤とした簡便かつ迅速的な大規模誘導体ライブラリーの構築と MraY 阻害剤開発に取り組んだ。

まずは、全合成研究を行った。合成計画を立てるにあたり、筆者は、ツニカマイシンと MraY/GPT 基質との構造類似性に着目した。すなわち、ツニカマイシンは、酵素基質とウリジン部が共通し、また、ガラクトサミン部が酵素基質のジリン酸と Mg²⁺がキレートした 6 員環構造を模倣していると考えられることから、対応するツニカミニルウラシルが、酵素阻害におけるファーマコフォアと考えた。そこで、この骨格を先に構築し、脂溶性側鎖、GlcNAc 部を合成終盤で導入することで、これらの部位を変換した誘導体を効率的に供給できると考え、新規全合成法を立案した。保護ウリジン 5'-アルデヒドに対して、アセチルフランの TMS エノールエーテルとの Mukaiyama アルドール反応を行った。ルイス酸として BF₃OEt₂ を用いると望みの 5'-R 体がほぼ完全なジアステレオ選択性で得られたのに対し、SnCl₄ を用いると立体選択性は完全に逆転した。得られたアルドール体の水酸基の保護、ケトンの還元、Achmatowicz 反応により、ジヒドロピラン環を有する化合物を得た。続いて、ヘミアセタールの TBS 保護とエノンの還元により得られたアリルアルコールに対して、Ichikawa アリルシアナート転位を行うことで 10'-イソシアナート体を得たのち、ワンポットで TAS-F を作用させることで、隣接する TBS 基の除去、生じた水酸基のイソシアナートへの分子内求核付加により、シス縮環オキサゾリジノンを得た。シス縮環構造とすることで、次のジヒドロキシル化は、良好なジアステレオ選択性で進行し、ツニカミニルウラシル骨格に含まれる全ての官能基がそろった化合物を得た。その後、保護基変換を行い、グリコシル化前駆体へと導いた。ツニカマイシンに特徴的な 11 β ,1 α -トレハロース型グリコシド結合構築のため、グ

リコシル化の検討を行ったところ、2-アジド-2-デオキシンググルコシルイミデートを用いた Schmidt 法が良い結果を与えた。すなわち、溶媒として CH_2Cl_2 やトルエンでは収率、選択性が不十分であったが、 Et_2O を用いると選択性 14:1、収率 84% で望みのグリコシドが得られた。最後に、アジド基のアセトアミド基への変換、脂溶性側鎖の導入、脱保護を行うことで、ツニカマイシン V の全合成を達成した。

続いて、確立した合成法を基に構造活性相関研究を行った。まずは、ファーマコフォアを確定するべく、ウリジン部、脂溶性側鎖部、GlcNAc 部の各種欠損体の *MraY* 阻害活性を評価したところ、脂溶性側鎖部、GlcNAc 欠損体は弱いながらも阻害活性を有していたのに対し、ウリジン欠損体は、完全に阻害活性が消失した。このことから、当初の想定通り、ツニカミニルウラシルがツニカマイシンのファーマコフォアであることがわかったため、続いて、脂溶性側鎖部について研究を行った。その結果、*MraY* 阻害活性に関しては、側鎖部へのベンゼン環の導入や、不飽和アミド部の還元は許容であった。また、アルキル基の長さとも *MraY* 阻害活性は相関しており、合成した中では、オレート誘導体が最も強く、天然物より約 5 倍強い *MraY* 阻害活性を示した。また、抗菌活性は *MraY* 阻害活性と相関していた。殺細胞活性は *MraY* 阻害とは異なり、天然物が最も強く、不飽和アミド部の還元体やベンゼン環導入誘導体も総じて殺細胞活性が減弱していた。

GlcNAc 部に関しては、2017 年に解かれたツニカマイシン-*MraY* 複合体構造と、Duke 大学との共同研究により解いたツニカマイシン-GPT 複合体構造を利用した。両複合体構造を比較すると、ツニカマイシンの GlcNAc 部の認識が大きく異なっていた。*MraY* では、GlcNAc 部 3 位水酸基部分に広い空間があるのに対して、GPT では、ループ領域によって厳密に認識され、酵素の壁が近接していた。そこで、筆者は、ツニカマイシン GlcNAc 部 3 位水酸基に置換基を導入することで、*MraY* 阻害活性は維持しつつ、GPT 阻害活性のみを減弱できると考え、*MraY* 基質の一部分を有する MurNAc 誘導体を設計、合成した。MurNAc 誘導体は、期待通り *MraY* 阻害活性は維持し、GPT 阻害活性は約 1600 倍低下した。しかし、抗菌活性の向上がみられなかったため、側鎖部誘導体の中で最も *MraY* 阻害活性の高かったオレート側鎖を導入した MurNAc-オレート誘導体を合成、評価したところ、殺細胞活性を示さないまま、天然物よりも *MraY* 阻害活性が約 10 倍、抗菌活性が 4 倍向上した。今後は、さらなる抗菌活性の向上を図る。

ここまで、ツニカマイシン誘導体を 17 種合成してきたが、その供給に 1 年以上を要するなど、天然物創薬では誘導体供給の面で課題がある。また、合成時の構造決定と生物活性評価に必要な化合物量にも解離があり、合成上多くのリソースを無駄にしている。一方で、低分子創薬では、2 つのフラグメントを連結する最終の反応をアッセイプレート上で行うことで誘導体ライブラリーを一挙に構築し、反応混合物をそのまま酵素活性評価する手法が報告されている。筆者は、この方法が天然物誘導体合成の欠点を補えると考えた。また、これまでの報告では、フラグメントの連結にアミド化や CuAAC を用いており、毒性のある残渣により細胞系への適用に限られる。また、*MraY* 阻害剤では、酵素系と細胞系での活性の乖離があることから、細胞系での評価も行えるよう、試薬を使用しないヒドラゾン形成反応により最終の連結を行うこととした。すなわち、ツニカマイシンとムライマイシンのファーマコフォアを抽出したコアアルデヒドと、アシルヒドラジドフラグメントを、アッセイプレート上で混合、濃縮することでヒドラゾン誘導体ライブラリーを合成し、そのまま *MraY* 阻害活性、抗菌活性を評価する。まずは、モデル化合物を用いて、ヒドラゾンの生成と生物活性評価用溶液中での安定性に問題がないことを確認したのち、コア 4 種、ヒドラジン 98 種から、計 392 化合物からなるライブラリーを合成し、その活性を評価した。その結果、ツニカマイシン型は *MraY* 阻害、抗菌活性ともに、長鎖脂溶性アルキル基が必要であり、特に Lys を導入したものが良好な活性を示した。ムライマイシン型では、*MraY* 阻害活性と抗菌活性に乖離のある誘導体はいくつか得られ、細胞系での評価を行うことが重要であった。最後に、ライブラリーの結果を受け、*in vivo* 評価を見据え、化学的、生物学的に不安定と考えられるヒドラゾン結合をより安定なアミド結合へと置き換えた誘導体を複数合成した。これらアミド誘導体はヒドラゾン誘導体を遜色ない活性を示し、薬剤耐性菌を含むグラム陽性菌に対して強い抗菌活性を示し、一部の尤度津愛はグラム陰性菌に対しても抗菌スペクトルが拡大した。今後は、*in vivo* 評価により、創薬リード候補化合物へとブラッシュアップさせていく。