HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ペプチドスキャニング法と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［全文の要約］
Author(s)	家口, 凜太郎
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。 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15311号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89504
Type	doctoral thesis
File Information	Rintaro_Kaguchi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　　氏 名　家 口 凜 太 郎

学 位 論 文 題 名

ペプチドスキャニング法と *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

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、ペプチドスキャニング法が知られている。例えばアラニンスキャニングでは、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、スキャ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。そこで本研究では、スキャニングに使用する誘導体を、スキャニングだけでなく、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ャ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ャニングする。次に、置換基の導入が可能と判断されたスキャ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、親ペプチドのスキャニングと、引き続く誘導体合成とをシームレスに遂行可能である。本研究で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。

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 個のスキャ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、Dab^{4} の側鎖のアミノ基と Thr^{10} 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、Thr^{10} 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、各スキャ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、各スキャ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。

得られたスキャ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 のスキャニングを行ったところ、Dab^{1}、Thr^{2}、Dab^{3}、Dab^{8}、Dab^{9}、Thr^{10} 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 つのスキャニング誘導体から誘導展開を行うことで、活性化合物を探索することとした。また、Dab^{5}、$D\text{-}Phe^{6}$、Leu^{7} 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

コールを持つスキャ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。スキャ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 つのスキャ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、前述のスキャニングで活性を示した 3 つのスキャニング誘導体から、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、スキャニングで活性を示さなかった 3 つのスキャ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、前述のスキャ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ピド 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、「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 個のスキャ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ャニング誘導体が見出された。そこで、このスキャ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、同様にスキャ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ャニングの性質を考察した。アラニンスキャニングとの比較から、スキャ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、アラニンスキャニングでは“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ャニングでは、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、スレオニンを有するスキャ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、スキャ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、スキャニング誘導体から直接誘導展開を行うことで、活性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ャ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。