



Title	ヌクレオシド系天然物を基盤としたMray阻害剤の開発研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	日下, 慎太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15314号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89662
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shintaro_Kusaka_review.pdf, 審査の要旨



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 日下 慎太郎

審査担当者	主査	教授	市川 聡
	副査	教授	周東 智
	副査	准教授	薬師 寺文華
	副査	准教授	渡邊 瑞貴

学位論文題名

ヌクレオシド系天然物を基盤とした *MraY* 阻害剤の開発研究

博士學位論文審査等の結果について（報告）

既存の抗生物質が効かない多剤耐性菌の蔓延は、公衆衛生上の国際的な懸念事項であり、新規抗菌薬の創製が急務となっている。*MraY* は細菌細胞壁であるペプチドグリカンの生合成経路における脂質サイクル部の最初の酵素である。本酵素は細菌に普遍的に存在するうえにその欠損は致死的であるため、新規抗菌薬の標的として注目されている。*MraY* を阻害するヌクレオシド系天然物は様々なケミカルクラスごとに特徴的な抗菌スペクトルを有し、薬剤耐性菌にも抗菌活性を示すものもある。日下氏は *MraY* 阻害ヌクレオシド系天然物に着目し、新規抗菌薬の創製に寄与する知見の獲得を目的として、1) カブラマイシンの新規全合成の確立と構造活性相関研究、2) ヌクレオシド系天然物誘導体の配座制御研究に取り組んだ。

1) カブラマイシンの新規全合成の確立と構造活性相関研究

カブラマイシン類は放線菌より単離されたヌクレオシド系天然物であり、結核菌を含む *Mycobacterium* 属に対して選択的なスペクトルを有する。化学構造的な特徴として、(5*R*)-*C*-カルバモイル-3-*O*-メチルウリジンの基本骨格とし、5'位水酸基にジヒドロピラヌロン酸がグリコシル化し、さらにカプロラクタム部がアミド結合により連結している事が挙げられる。本化合物の構造活性相関研究(SAR)は複数報告されているものの、各研究間で必ずしもその結果が一致しないことから、日下氏は、まず SAR の再解析を行うこととした。

カブラマイシンの構造活性相関研究に適した合成法の開発を目的として、様々な糖受容体に対して反応性が高く、かつ立体選択的に進行する Ferrier 転移を用いたグリコシル化を適応することとした。3-*O*-メチルウリジン保護体から 3 工程で調製したシアノヒドリン体のジアステレオマー混合物に対して、*D*-グルカール保護体を用いた Ferrier 転移により、所望の 5-(*S*)-不飽和 α -グリコシドを 4 工程収率 27%、および 5-(*R*)-エピマー体を 23%で得た。得られたオレフィン体の立体選択的なジヒドロキシル化によりマンノース骨格を構築し、生じた水酸基をアセチル化した。本研究では、5-(*S*)-シアノ誘導体を合成するため合成後半でシアノ基を水和することとし、各種変換を行いカブラマイシンの全合成を達成した。本合成経路を用いて、リボース部を各種変換した 4 種の誘導体を合成し、*MraY* 阻害試験および抗菌試験を実施した。*Mycobacteria* 属に対する抗菌活性は *MraY* 阻害活性と良く一致し、カブラマイシンおよび 3-*O*-脱メチル誘導体は各 *Mycobacteria* 属に対して中程度の抗菌活性を示し、残る 3 種の誘導体は抗菌活性を示さなかった。先行研究において 3-*O*-脱メチル誘導体は *MraY* 阻害活性がほとんど無いとされているが、本検討ではカブラマイシンに比べて 1/6 程度しか低下しなかった。3-*O*-脱メチル誘導体は、合成上からアクセスしやすい構造であることからからも、抗菌薬リードとして使用できる可能性が示された。

カブラマイシンは *Mycobacterium* 属に特異的な抗菌活性を示し、*EAKAPE* 病原菌に対する抗菌活性を示さない。抗菌スペクトルが狭い要因としては、配列の保存性が低い *MraY* のポケットにカブラマイシンのカプロラクタム部の格納が挙げられ、カプロラクタム部の変換は抗菌スペクトルの拡大が期待される。同部位の効率的な変換を目的として、先に見出した 3-*O*-脱メチル誘導体を基盤とした網羅的な誘導体群（ライブラリー）を合成し、抗菌スペクトルの拡大を図った。先の合成中間体から 5 工程で合成したアルデヒド体を用いて、ヒドラゾン形成反応によるライブラリーを合成した（96 誘導体）。これらの *MraY* 阻害試験および *EAKAPE* 病原菌に対する抗菌試験を評価した。その結果、抗菌スペクトルの拡大が、安息香酸ヒドラジドにおいて一部見られ、長鎖アシル基を有するアミノ酸ヒドラジドにおいて最も多く見られた。これらの抗菌スペクトルは天然物のカブラマイシンにない特徴であり、抗菌薬としての展開において重要な知見を得た。

2) ヌクレオシド系天然物誘導体の配座制御研究

続いて、日下氏は、ヌクレオシド系天然物誘導体の配座制御研究を行った。これまでにヌクレオシド系天然物に対する *MraY* との共結晶構造を複数解明されているが、ヌクレオシド部の配座の自由度が高く、共結晶構造に基づいた薬剤設計の適応が困難であった。一方で、ヌクレオシド系天然物のリボース環は、*MraY* との直接的な相互作用は見られず、各相互作用部位を空間的に配置する足場としての役割が想定され、その配座制御は *MraY* 阻害活性の発現に重要と考えられる。ヌクレオシドの配座はパッカリングや二面角 φ (γ :O5-C5-C4-O4) により規定され、これらは独立したパラメーターでなく互いに相互作用するため、同時制御が困難である。日下氏は、ムライマイシン D2 の結合配座に着目し、パッカリングをN型に完全固定できる LNA/2',4'-BNA 骨格を、アミノリボシル-ウリジン部に適応することとした。本分子設計により、分子全体の配座はおおよそ二面角 φ (γ) を考慮すれば良く、5'位置換基の導入により二面角 φ (γ) を制御可能である。これらの化合物は以下のとおりに合成した。まず、LNA/2',4'-BNA ウリジン 5'-アルコール体を IBX 酸化して得たアルデヒド体に対して、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 存在下で臭化エチニルマグネシウムを付加させ、2 工程 65% でプロパルギルアルコール体を得た。続く、水素添加によりプロピルアルコール体に変換した後、改良モッシャー法により 5 位の立体化学を *S* と決定した。続いて LNA/2',4'-BNA ウリジンの各アルコール体に対して、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 存在下でフッ化アジドリボースを用いた β -選択的ナリボシル化反応によりアジドリボシル体を得た。続く官能基変換と脱保護により、各 LNA/2',4'-BNA 誘導体を 4 工程 31-67% で得た。次に $^1\text{H-NMR}$ による配座解析を実施したところ、LNA/2',4'-BNA 誘導体の 5'位プロトンから 3'/5''位プロトンへの NOE が観測されたことから、二面角 φ (γ) は所望の-*sc* 配座が優先し、ゴーシュ効果($\sigma_{\text{C5-H}} \rightarrow \sigma_{\text{C4-O4}}^*$)に起因すると考えられた。 *MraY* 阻害試験を実施したところ、LNA/2',4'-BNA 誘導体は 5'位置換基の導入に伴う活性向上が確認され、特に 5'-(*S*)-エチル体において約 10 倍の活性向上が見られた。活性差の要因を解析すべく二面角 φ (γ) の変化に伴うポテンシャルエネルギーを計算した。5'-(*S*)-エチル体は 5'位エチル基による立体障害のため *ap* 配座において高エネルギー状態となり、結合配座である-*sc* 配座の存在割合の増加が活性向上要因であると考えられた。5'位置換基による配座制御および活性向上効果が確認されたため、更なる置換基の変換を実施し、計 9 種の LNA/2',4'-BNA 誘導体の *MraY* 阻害試験および抗菌試験による評価を行った。その結果、LN、A/2',4'-BNA 誘導体において配座-活性相関を明らかにし、近年多剤耐性の発達が問題となっている *Mycobacterium. abscessus* に対して抗菌活性を示す 5'-(*S*)-エチル体および 5'-(*R*)-フェニルエチニル体を見出した。

これを要するに、日下氏の研究業績は、*MraY* 阻害ヌクレオシド系天然物に着目し、新規抗菌薬のリード化合物の設計指針とシード化合物を取得したものであり、創薬化学に対して大きな貢献をするものである。よって日下氏は、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。