

〔別紙 2〕

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 村 井 元 紀

村井元紀は、「カイコシン E の全合成および構造機能相関研究」のタイトルで、研究を展開した。以下に、その詳細を述べる。

関水・浜本らによって *Lysobacter* sp. の培養上清より単離構造決定された カイコシン E (**1a**, Figure 1a) は、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を含むグラム陽性菌に対して増殖阻害活性を示す。さらにこの化合物は MRSA 感染モデルマウスにおいても治療活性を示すことから新規な抗生物質の候補化合物として有望視されている。**1a** は、5 つの D アミノ酸を含む 12 残基の環状デプシペプチドであり、主鎖の N-メチル化・スレオニン残基に結合した C7 分岐鎖などの構造的特徴を持つ。また、**1a** は微生物の電子伝達系の構成要素であるメナキノン類(MK-N, Figure 1b)という新規な標的を持ち、膜破壊によって抗菌活性を示すと考えられている。しかし、その詳細な分子認識機構は未解明である。村井は、カイコシン E (**1a**) とその種々の類縁体の統一的な合成と、メナキノン類(MK-N) との相互作用機構や抗菌活性発現機構の解明を研究目的とした。

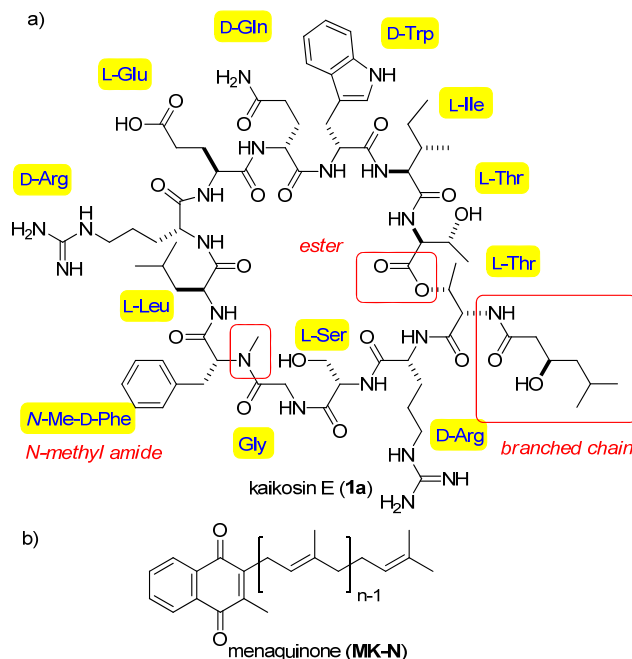


Figure 1. (a) Structure of kaikosin E (**1a**). (b) Structure of menaquinone (MK-N)

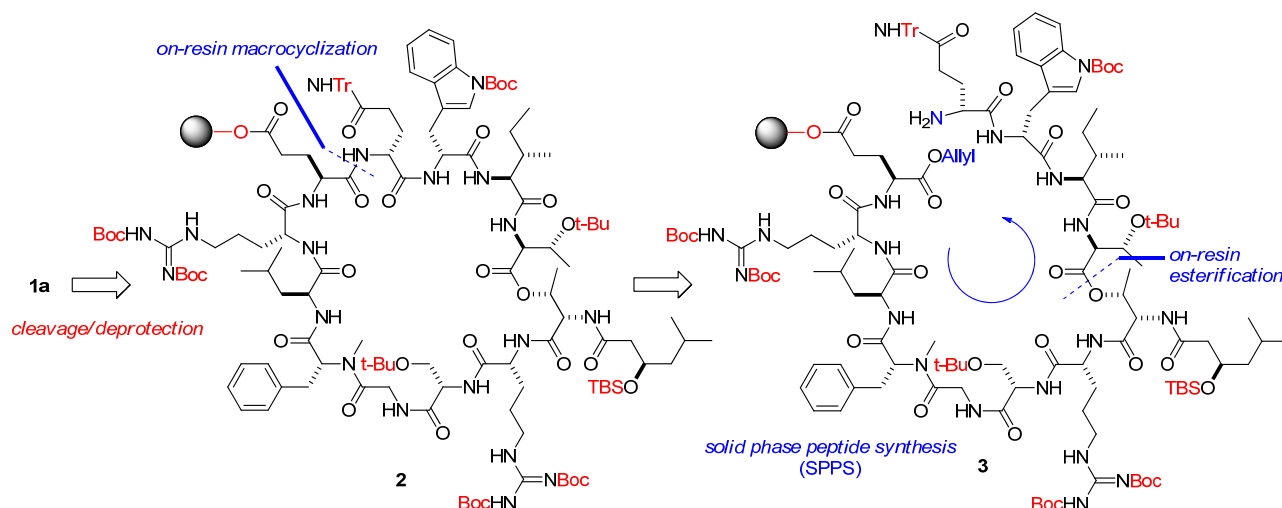
1. カイコシン E およびそのエナンチオマーの全合成

村井は、**1a** を固相で全合成する計画を立てた(Scheme 1)。ペプチド固相合成は液相合成に比して反応の自動化・効率化の点で優れた手法である。また、**1a** の構造的特徴である 37 員環を構築する際、固相担持化合物の擬希釈効果によってマクロ環化反応における多量体生成の抑制も期待できる。中間体 **2** はグルタミン酸残基で固相樹脂に担持されており、すべての側鎖の官能基は酸性条件下で脱保護可能な *t*-Bu 基, Tr 基, TBS 基および Boc 基で保護されている。**2** はグルタミン酸残基主鎖のカルボキシ基を中性条件下脱保護可能なアリルエステルとして保護した中間体 **3** から合成し、ペプチド伸長は Fmoc ペプチド固相合成法によって行うこととした。

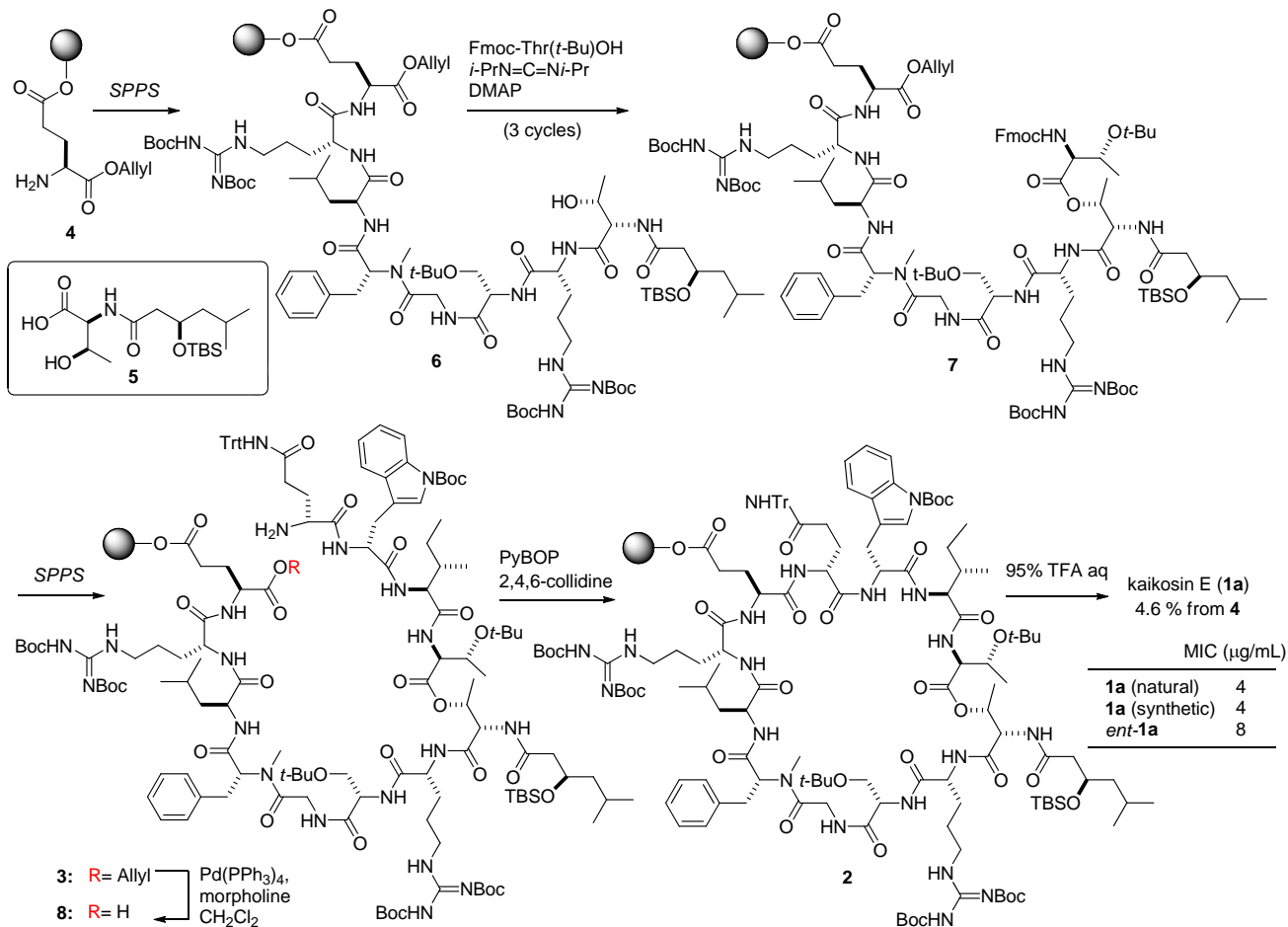
出発原料であるグルタミン酸誘導体担持 Barlos 樹脂 **4** からマイクロ波照射下 Fmoc アミノ酸試薬および別途合成したスレオニンフラグメント **5** を順次縮合していき、化合物 **6** を合成した(Scheme 2)。続く **6** の二級水酸基に対するエステル化反応も同じく固相上で行った。エステル化は 10 当量の試薬を用いて 3 回繰り返すことで反応を完結させて、未反応の **4** 由来の副生成物の生成を防いだ。そ

の後再びマイクロ波照射下のペプチド伸長を行い **3** へと導いた後、アリルエステルの脱保護を行い環化反応前駆体 **8** を合成した。得られた **8** を 2,4,6-コリジン存在下 PyBOP によってグルタミン酸残基のカルボキシル基を活性化させることで環化体 **2** を合成した。**2** は 95% TFA 水溶液により樹脂から切り出すと同時に側鎖のすべての保護基を脱保護したのち逆相 HPLC による精製を行い、カイコシン E (**1a**) を原料 **4** から 24 工程 4.6% で合成した。合成した **1a** の各種 NMR スペクトルや HPLC の保持時間は天然物のものと一致した。さらにメシチリン感受性黄色ブドウ球菌を用いた抗菌活性試験においても、天然物と同等の抗菌活性を示した。

Scheme 1. Retrosynthesis of kaikosin E (1a)

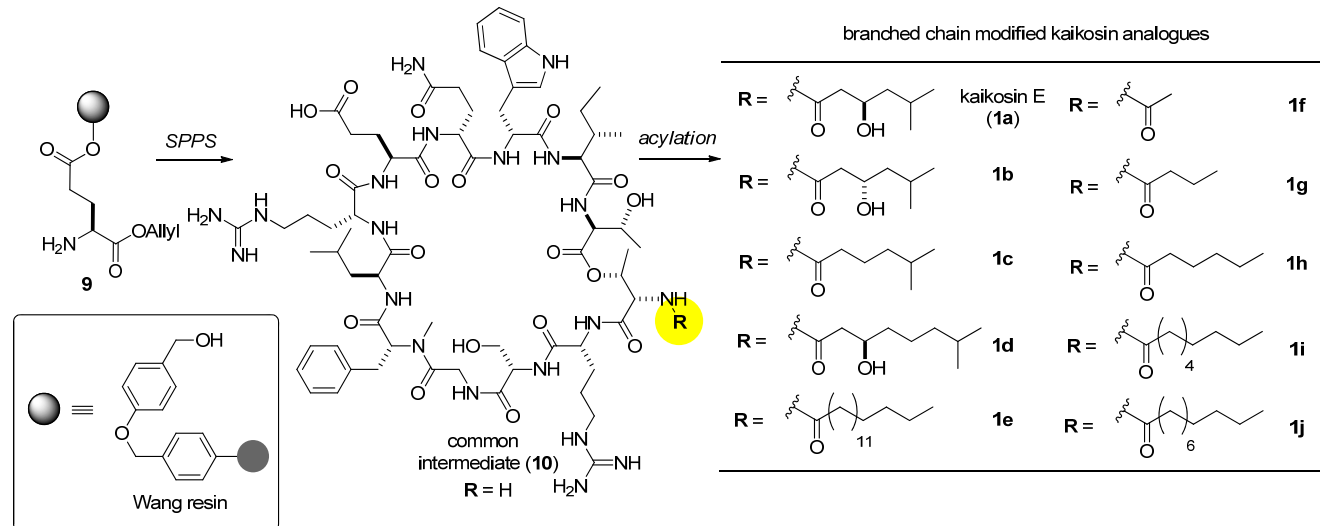


Scheme 2. Total synthesis of kaikosin E (1a)



さらに村井は、**1a** のエナンチオマー(*ent-1a*)を同様の手法で合成した。興味深いことに得られた *ent-1a* は **1a** と同様の抗菌活性を維持しており、抗菌活性の発現に不斉点を持たないメナキノン類との相互作用が関与していることが支持された。

2. 分岐鎖部位改変カイコシン E 類縁体の合成と構造活性相関研究



Scheme 3. Synthesis of branched-chain modified kaikosin E analogues

カイコシン E (**1a**)の構造的特徴の一つにスレオニン残基に結合した C7 分岐鎖が挙げられる。標的分子と考えられるメナキノン類(MK-N)は非常に疎水性の高いため、C7 分岐鎖部位が MK-N との相互作用に重要である可能性があった。村井は、抗菌活性に対する C7 分岐鎖部位の重要性を評価するため、分岐鎖部分を改変したカイコシン E 類縁体を網羅的に供給可能な合成経路を新たに計画した。

この合成経路では、分岐鎖部位を導入する共通中間体 **10** へのアシル化反応を最終段階で行うため、種々の分岐鎖部位改変体を容易に合成できる(Scheme 3)。共通中間体 **10** は **1a** と同様の手法でグルタミン酸誘導体担持 Wang 樹脂 **9** から 23 工程 25.6 %の収率で合成した。最終段階のアシル化反応は、分岐鎖に対応するカルボン酸を酸無水物として活性化することで進行し、種々の分岐鎖部位改変カイコシン E 類縁体を調製した。合成した類縁体を抗菌活性試験の結果を Table 1 にまとめた。分岐鎖部分の二級水酸基の立体化学は活性に影響を与えず、水酸基を失っても抗菌活性の減弱はわずかにとどまった(Table 1, **1a** vs. **1b**, **1c**)。一方、炭素差の長さを変更すると抗菌活性が減弱し、分岐鎖を持たない共通中間体 **10** は抗菌活性を失っていた(**1a** vs. **1d-e**, **10**)。強い抗菌活性を維持するためには分岐鎖部位の炭素数は 6 以上である必要があるが、炭素数 16 の分岐鎖を持つ **1e** は抗菌活性を失っていた(**1a** vs. **1e-j**, **10**)。このように、分岐鎖部位の疎水性と抗菌活性の間に明確な相関関係は見られなかったため、カイコシン E とメナキノン類との相互作用は単純な疎水性相互作用ではないことが示唆された。

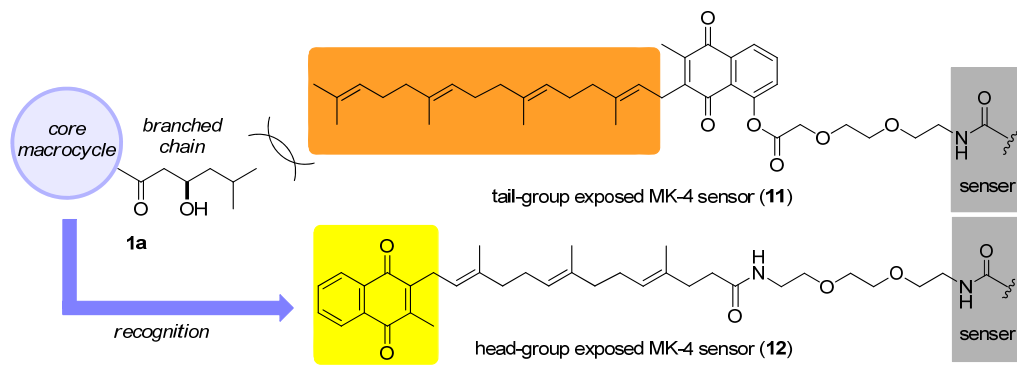
Table 1. Minimal inhibitory concentration of synthetic kaikosin derivatives

compound	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	compound	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
1a	4	10	>128
1b	4	1f	128
1c	8	1g	16
1d	16	1h	8
1e	>128	1i	8
		1j	16

3. 分岐鎖部位改変カイコシン E 類縁体とメナキノン類の結合親和性評価

そこで村井は、メナキノン類のカイコシン E 認識部位を特定するため、合成した分岐鎖部位改変カイコシン E 類縁体を用いたバイオレイヤー干渉法(BLI)²による結合親和性試験を行った(Figure 2)。測定は、それぞれ異なる部位をリンカーを介して基板上に担持した二種類の MK-4 センサー(**11**, **12**, Scheme 4)を用いた。この結合親和性測定において抗菌活性を持つ類縁体の間では結合親和定数 (K_D)には大きな差は見られなかったものの、**12** に比し、**11** を用いた測定では横軸に対応する結合速度定数(k_{on})の分布に大きなばらつきが見られた。

センサー**11**はMK-4が芳香環を含むヘッド側で基盤上に結合しているため、イソプレンユニットの繰り返しで構成されるテール側が分析対象に対して露出している。類縁体**1e**, **1i**, **1j**の比較的大きな分岐鎖(炭素数 16, 11, 9)が、コア骨格と結合する際の立体障害要因となり、**11**を用いた測定ではMK-4に対する k_{on} が小さくなったと解釈した。すなわち、これらの実験結果は、カイコシンEのコア骨格とMK-4のヘッドとが相互作用しており、分岐鎖構造はMK-4との結合に直接関与しないことを示唆した。



Scheme 4. Proposed molecular recognition between kaikosin E (**1a**) and MK-4

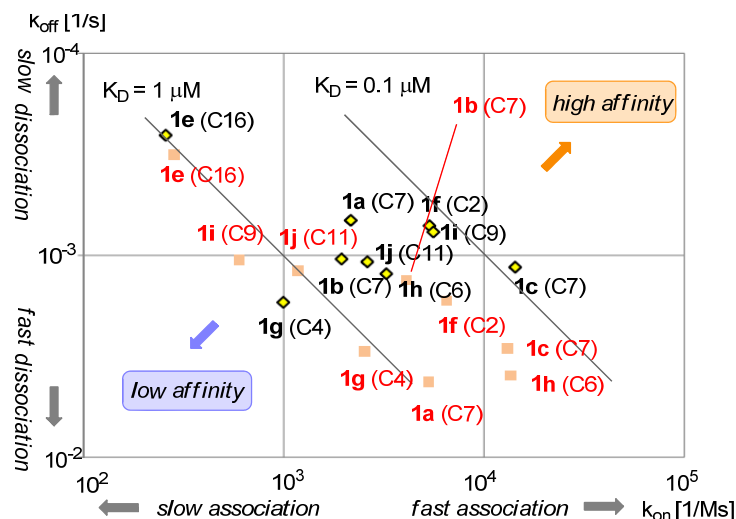


Figure 2. Isoaffinity plot of k_{on} and k_{off} of branched chain modified kaikosin E analogues to tail-group exposed MK-4 (**11**, orange) and head-group exposed MK-4 (**12**, yellow).

以上のように村井は、ペプチド固相合成と樹脂上でのマクロ環化反応によってカイコシンEの初の全合成を達成した。また活性発現に対する分岐鎖部位の重要性を評価するため、分岐鎖部位の付加を最終段階に設定した合成経路も確立した。合成された種々の類縁体の抗菌活性試験の結果、分岐鎖構造は活性発現には必須であるものの、分岐鎖部位の疎水性と抗菌活性には明らかな相関関係は見られなかった。バイオレイヤー干渉法による結合親和性試験の結果、カイコシンEの分岐鎖は標的と考えられるメナキノン類の認識には関与せず、37員環コア骨格の重要性が示唆された。

この成果は、薬学研究に寄与するところ大であり、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。