

論文題目 Comprehensive Structure-Activity Relationship Study of Gramicidin A
(グラミシジン A の大規模構造活性相関による新規生物活性分子の創出)

氏 名 高田 悠里

【序】グラミシジン A (**1**, Figure 1a)は、15 個の D,L-アミノ酸が交互に配列する抗菌ペプチド天然物である¹⁾。**1**は、強力な抗菌活性を示す一方で、顕著な哺乳細胞毒性を示すため、抗菌薬としての適用は著しく限られている。**1**は、脂質 2 重膜中で $\beta^{6,3}$ -ヘリックスと呼ばれるらせん構造を形成し、N 末端で会合した 2 量体がイオンチャネルとして機能する(Figure 1b)²⁾。**1**の示す抗菌活性および哺乳細胞毒性はイオンチャネル形成に起因することが想定されているが、詳細については未だ不明な点が多い。そこで私は、顕著な生物活性を示す **1** を構造基盤とし、多様な側鎖構造パターンを持つ数千種類の **1** 類縁体群を合成・評価することで、**1** の持つ抗菌活性・細胞毒性を分離し、選択的な活性を示す新規 **1** 類縁体を創出することを研究目的とした。

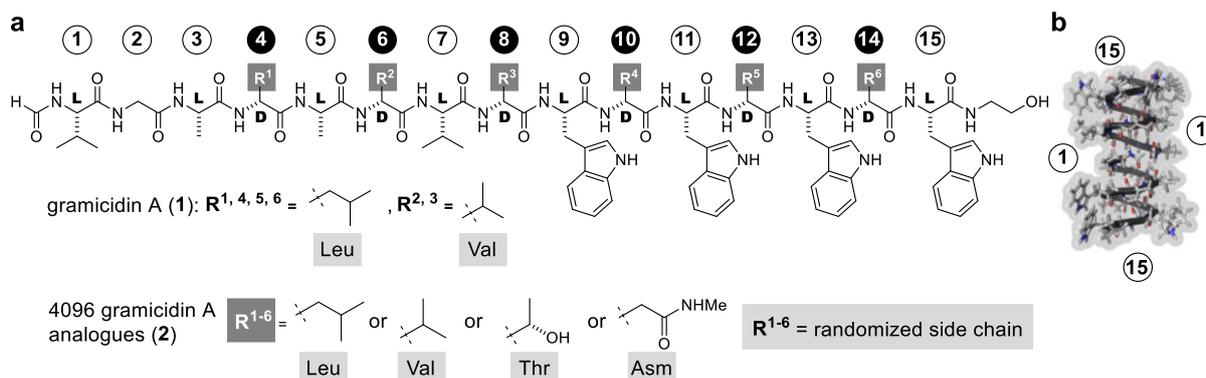


Figure 1. (a) Structures of gramicidin A (**1**) and 4096 gramicidin A analogues (**2**). (b) A $\beta^{6,3}$ -helical head-to-head dimer of **1** (PDB ID: 1MAG). Asm = *N*-methyl asparagine.

【方法・結果】

1. グラミシジン A 類縁体ライブラリーの設計・構築・スクリーニング

数千種類の **1** 類縁体を得るため、one-bead-one-compound (OBOC)³⁾ライブラリーの構築を計画した。OBOC ライブラリーとは、split-and-mix 法によってランダムにアミノ酸残基が組み合わされたビーズ結合型化合物群のことを指す。Split-and-mix 法により置換する第 4、6、8、10、12、14 残基には、疎水性アミノ酸である Leu、Val に加え、3 次元構造および会合状態や生体内分子との相互作用を変化させる目的で、水素結合形成可能な側鎖を有する Thr、Asm⁴⁾を用いた(Figure 1a)。実際のライブラリー合成では、*N*_α-アミノ基を Fmoc 基で、また側鎖ヒドロキシ基およびメチルアミド基をそれぞれ *t*-Bu 基および 2,4,6-トリメトキシベンジル(Tmb)基で保護した **4-7** (Figure 2)をモノマーとして用いた。固相担体としては、多様な溶媒を許容し、均一な大きさを有する TentaGel を選択した。これに 4-ヒドロキシメチル安息香酸(HMBA)リンカーおよび Trp を導入した **3** を出発物質とし、split-and-mix 法を適用したマイクロウェーブ Fmoc 固相合成によりペプチド鎖の伸長および置換を行い、**8** を得た。N 末端アミンに対するホルミル基の導入と側鎖の脱保護を経て、**4**⁶ =

4096種類からなる **1** 類縁体 OBOC ライブラリー **10** を 13584 個のビーズとして合成した (Figure 2)。これらのビーズをマイクロプレート上で分離した後、エステルアミド交換によりエタノールアミンを C 末端に導入すると同時に、ビーズから切断して得た **1** 類縁体ライブラリーをスクリーニングに付した。ここでは、**1** の持つ抗菌活性、細胞毒性を評価でき、微量 (< 3 μg) かつ夾雑物を含む系にも適用可能な評価法として、細菌膜を模倣したホスファチジルグリセロール含有リポソームを用いた H^+/Na^+ イオン透過活性スクリーニングと P388 マウス白血病細胞を用いた細胞毒性スクリーニングを採用し、上記ライブラリーを統一的に評価した。その結果、**1** と同等以上の H^+/Na^+ イオン透過活性と細胞毒性 (細胞生存率 20% 未満) を示す A 群 (74 ビーズ) の他に、**1** と同等以上のイオン透過活性を示す一方、細胞毒性が減弱した (細胞生存率 30% 以上) B 群 (519 ビーズ) に該当する **1** 類縁体を得ることに成功した (Figure 3)。これらを、*S. pyogenes* に対する抗菌活性スクリーニングに付し、**1** と同等またはそれ以上の抗菌活性を示す化合物を得た (Figure 3)。また、MS/MS 解析により、全ヒット化合物の構造を決定した。その結果、B 群に該当する化合物 276 種、A 群に該当する化合物 41 種を見出した。これら計 317 種の化合物から、Figure 3 に示した方法により、20 種類の化合物を詳細な機能評価対象として選定した (A 群: **A1**、B 群: **B1**–**B19**)。

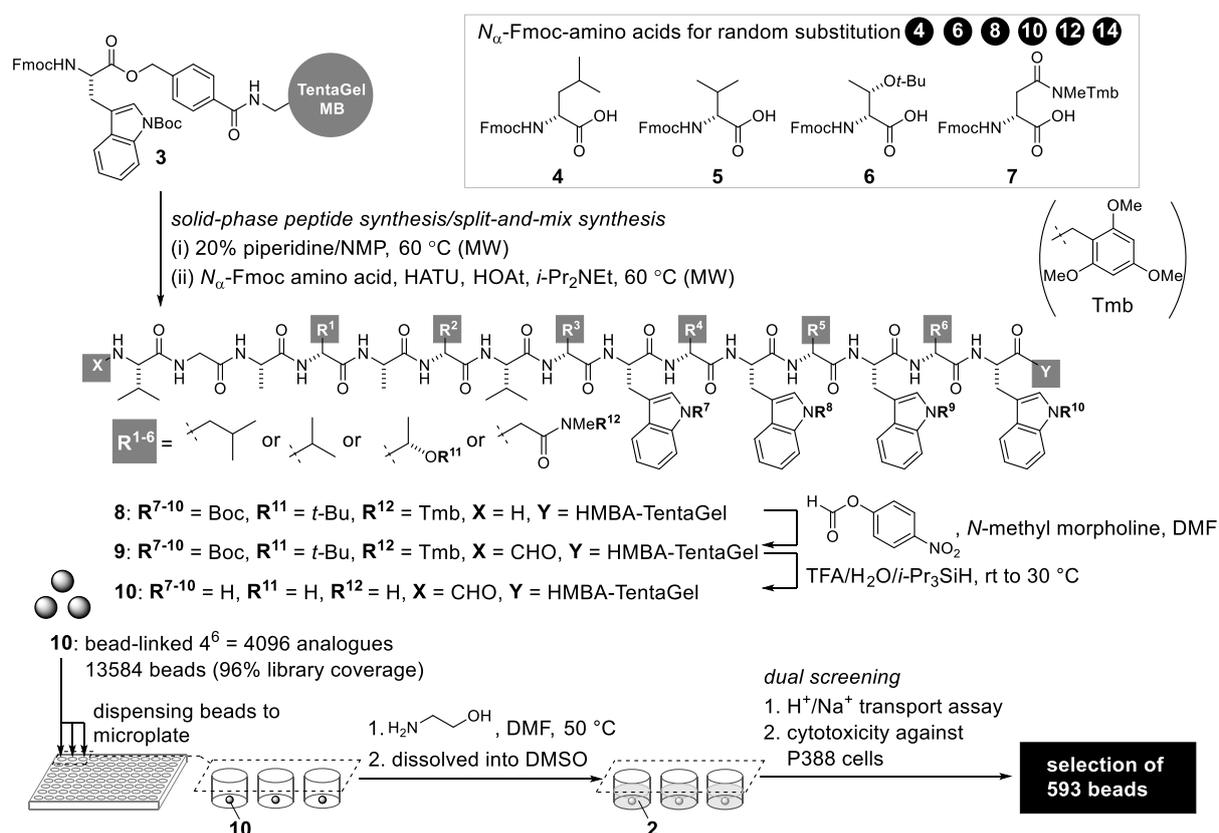


Figure 2. Construction of **1**-based OBOC library. TentaGel MB = TentaGel Macrobead, HATU = 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate, HOAt = 1-hydroxy-7-azabenzotriazole, MW = micro-wave, HMBA = 4-(hydroxymethyl)benzoic acid, Tmb = 2,4,6-trimethoxybenzyl.

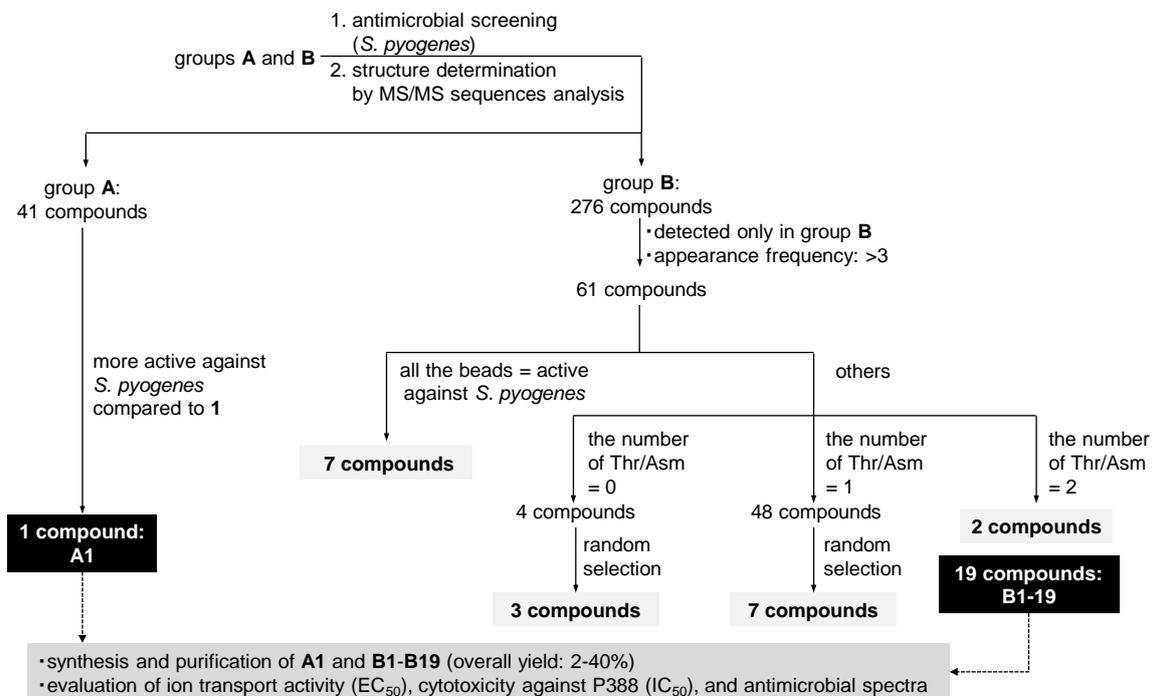
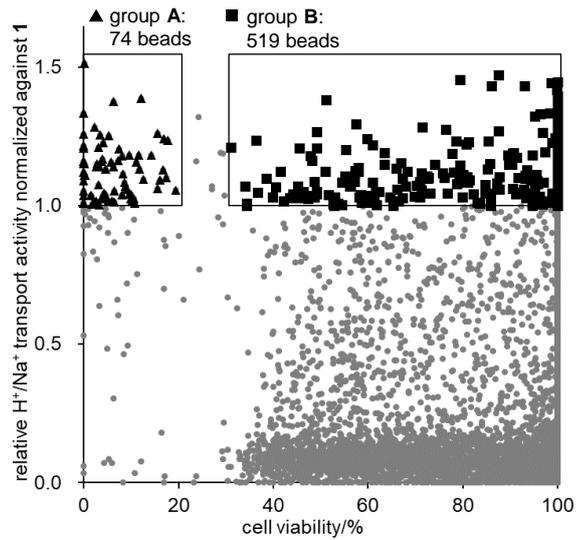


Figure 3. Selection of compounds **A1** and **B1-B19**.

2. 選定化合物のイオン透過活性・細胞毒性・抗菌スペクトル

20種類の選定化合物を mg スケールで合成・精製し、これらの H^+/Na^+ イオン透過活性と哺乳細胞毒性の容量作用関係および、グラム陽性菌に対する抗菌スペクトルを評価した(Table 1)。その結果、全化合物が **1** ($EC_{50} = 4.4$ nM)と同等もしくはそれ以上のイオン透過活性($EC_{50} = 1.3-7.5$ nM)を示した。さらに、これらの中から強力な抗菌活性を示すものも多数見出した。中でも、全ての菌株に対して **1** よりも 2-4 倍抗菌活性が増強した **A1** や、P388 細胞に対する細胞毒性が著しく減弱したにも関わらず、抗菌活性が増強した化合物 **B1-B6** が得られた。特に、**B4** は、P388 細胞に対する細胞毒性が著しく減弱した($IC_{50} = >1000$ nM)にも関わらず、抗菌活性が *S. pneumoniae* に対し

て2倍(MIC = 0.000015 µg/mL)、MSSA1 に対して4倍(MIC = 8 µg/mL)、*L. monocytogenes* に対して4倍(MIC = 2 µg/mL)増強した。また、同様の活性特性を示す類縁体として **B5** も得られた。興味深いことに、**B1** は、P388 細胞に対する細胞毒性が著しく減弱した(IC₅₀ = 387 nM)一方で、抗菌活性が *S. pneumoniae* に対して2倍(MIC = 0.000015 µg/mL)、MSSA1 に対して8倍(MIC = 4 µg/mL)、*L. monocytogenes* に対して2倍(MIC = 4 µg/mL)増強した。さらに、**B1** は、**B2–B6** の特性とは異なり、*S. pyogenes* に対して **1** とほぼ同等の抗菌活性 (MIC = 0.125 µg/mL)を示した。以上のように、天然物に比して優れた活性を有する新規 **1** 類縁体および高度に細菌選択的な毒性を示す新規 **1** 類縁体の創出を実現した。

Table 1. Ion transport activities, cytotoxicities, and antimicrobial activities of the library-derived compounds.

compound	ion transport activity/ EC ₅₀ (nM) ^a	cytotoxicity against P388/ IC ₅₀ (nM) ^a	MIC (µg/mL) ^b					
			<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i>	MSSA1	<i>L. monocytogenes</i>
1	4.4	6.2	0.0625	0.00003	2	0.5	32	8
group A								
A1	2.5	4.1	0.015	0.000015	1	0.25	8	2
group B								
B1	1.8	387	0.125	0.000015	16	2	4	4
B2	2.9	263	0.5	0.00003	4	2	32	16
B3	5.7	250	0.5	0.000488	16	2	8	4
B4	1.6	>1000	1	0.000015	8	4	8	2
B5	4.3	>1000	1	0.00003	32	4	8	8
B6	4.1	563	2	0.000244	64	2	8	4

^aAverage values of three independent experiments are displayed. ^bMinimum inhibitory concentration (MIC, µg/mL) determined by microdilution method. *S. pyogenes* = *Streptococcus pyogenes* SSI-9; *S. pneumoniae* = *Streptococcus pneumoniae* (clinical isolate); *S. agalactiae* = *Streptococcus agalactiae* JCM5671; *E. faecalis* = *Enterococcus faecalis* JCM5803; *L. monocytogenes* = *Listeria monocytogenes* 10403S.

【結語】 OBOC ライブラリー戦略を活用した 4096 種類の **1** 類縁体群の合成・評価により、極めて優れた生物活性特性を示す **1** 類縁体を多数創出することに成功した。これらの化合物は、有用な新規抗菌薬シーズとなることが期待される。また、以上の結果は、本戦略の応用が、多様なペプチド系天然物の内包する優れた特性をさらに拡張させる可能性を示した。

【参考文献】

- 1) Dubos, R. J.; Cattaneo, C. *J. Exp. Med.* **1939**, *70*, 249.
- 2) Ketchum, R. R.; Hu, W.; Cross, T. A. *Science* **1993**, *261*, 1457.
- 3) Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchňák, V. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411.
- 4) Hamada, T.; Matsunaga, S.; Fujiwara, M.; Fujita, K.; Hirota, H.; Schmucki, R.; Güntert, P.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12941.