

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 加治拓哉

加治拓哉は、「Comprehensive Structure-Activity Relationship Study of lysocin E (ライソシン E の網羅的構造活性相関研究)」のタイトルで、研究を展開した。以下に、その詳細を述べる。

ライソシン E (**1**, Figure 1)は、*Lysobacter* 属の細菌から単離・構造決定された環状デプシペプチド天然物である。**1**はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対して 4 µg/mL の最小発育阻止濃度(MIC)で抗菌活性を示すことから、新規 MRSA 薬のリード化合物として有望である。

1は既存の抗生物質とは異なる分子標的を有する。関水・浜本らによる先行研究により、**1**は細菌膜内のメナキノン(MK)と選択的に相互作用することが明らかにされている。MK は、細菌呼吸鎖における電子伝達に必須な補酵素である。**1**-MK 複合体の形成は、細菌膜の秩序を乱し、迅速な溶菌を引き起こすと考えられている。一方で **1**は、ほ乳類の呼吸鎖における補酵素であるユビキノン(UQ)とは複合体を形成しない。**1**の細菌選択的な作用は、MK に対する選択性に起因すると推定されている。しかしながら、その強力な抗菌活性発現に重要な **1**の構造要件についてはこれまで明らかにされていなかった。そのため、加治拓哉は **1**の網羅的な構造活性相関研究を実施し、分子作用機序に関連する側鎖官能基を明らかにすることと、より強力な類縁体を創出することを目的として研究に着手した。

まず加治は、**1**の側鎖官能基の重要性を調べるために、**1**の側鎖構造類縁体の設計・合成を行った。この構造活性相関研究に先立ち、**1**、MK、およびリン脂質の間に(1)塩基性のアルギニン側鎖グアニジンと、酸性のグルタミン酸側鎖カルボン酸またはリン脂質の極性頭部との静電相互作用、(2)フェニルアラニン側鎖ベンゼン環またはトリプトファン側鎖インドール環と、MK のナフトキノン環との芳香環相互作用、(3) N 末脂肪酸鎖と MK のイソプレレン鎖またはリン脂質脂肪酸鎖との疎水性相互作用の3つの相互作用の存在を仮定した。これらの相互作用のそれぞれの寄与を評価するために、14種類の類縁体 **2-15** を設計した(Figure 1)。

加治は、天然物である **1**、アミン体 **4**、**16a**、**16b**、および **16c** の合成は、一工程の化学選択的変換により、それぞれ類縁体 **2/3**、**5-7**、**8-13**、**14** および **15** へ効率的に導くことが出来ると予想した(Figure 2)。Fmoc 固相ペプチド合成戦略の適用により、煩雑な中間体の精製工程を最小限にし、主鎖構造の効率的な構築が可能となった(Figure 2A および 2B)。化合物 **25** を固相合成に用いることで、**1** および **4** のアシル鎖の導入を行った(Figure 2A、**22**→**34**→**35**→**1** または **4**)。一方、固相合成後に脂肪酸鎖を導入するため、化合物 **30** を固相合成に用いることでエステル結合および Boc 保護アミンを主鎖に導入した(Figure 2B、**22**→**37**→**38**→**16**)。これらの合成戦略を適用することで、**1**、**4**、**16a**、**16b**、および **16c** をそれぞれ 8.0、6.1、26、12 および 6.5% の総収率で合成した。続いて加治は、液相での化学選択的な 1 工程での変換反応を、合成したこれら無保護のペプチドに対して実施した。PyBOP の存在下、**1** に **34** または **35** を縮合させると、それぞれ 48 および 44% の収率でアミド類縁体 **2** および **3** が得られた。また、**36**、**37** および **38** をそれぞれ **4** に作用させることで、ジメチルグアニジン(**5**)、ウレア(**6**)およびアセチル(**7**)類縁体をそれぞれ 46、58 および 27% の収率で得た。さらに、クロロギ酸イソブチルおよび N-メチルモルホリン存在下、**39-45** から調製した活性エステルを **16a-16c** に作用させることで、**8**、**9**、**10**、**11**、**12**、**13**、**14** および **15** をそれぞれ 34、51、29、33、41、25、22 および 34% の収率で得た。

compounds	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	membrane disruption [%]				MIC [μg/mL]	compounds	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
						17 2.5 μM	10 μM	18 2.5 μM	10 μM							
lysocin E (1)		Ph	3-indolyl	guanidyl	OH	62		1.0		4	16a	H•TFA	Ph	3-indolyl	guanidyl	OH
2		Ph	3-indolyl	guanidyl	NHBn	64		0		4	16b	H•TFA	H	3-indolyl	guanidyl	OH
3		Ph	3-indolyl	guanidyl		93		0		2	16c	H•TFA	Ph	H	guanidyl	OH
4		Ph	3-indolyl		OH	62		2.2		4						
5		Ph	3-indolyl		OH	55		5.1		4						
6		Ph	3-indolyl		OH	7.4		0.9		8						
7		Ph	3-indolyl		OH	0	9.3	0	0	16						
8		Ph	3-indolyl	guanidyl	OH	51		0		16						
9		Ph	3-indolyl	guanidyl	OH	48		0		4						
10		Ph	3-indolyl	guanidyl	OH	65		0		2						
11		Ph	3-indolyl	guanidyl	OH	62		0		4						
12		Ph	3-indolyl	guanidyl	OH	42		0.7		4						
13		Ph	3-indolyl	guanidyl	OH	20		0		32						
14		H	3-indolyl	guanidyl	OH	0.8	65	0	0	8						
15		Ph	H	guanidyl	OH	0	0	0	0	> 128						

Figure 1. Structures of lysocin E (1), analogues 2-15, intermediates 16a-c, menaquinone-4 (17), and ubiquinone-10 (18). Membrane disrupting activities and antimicrobial activities of 1-15 are also displayed.

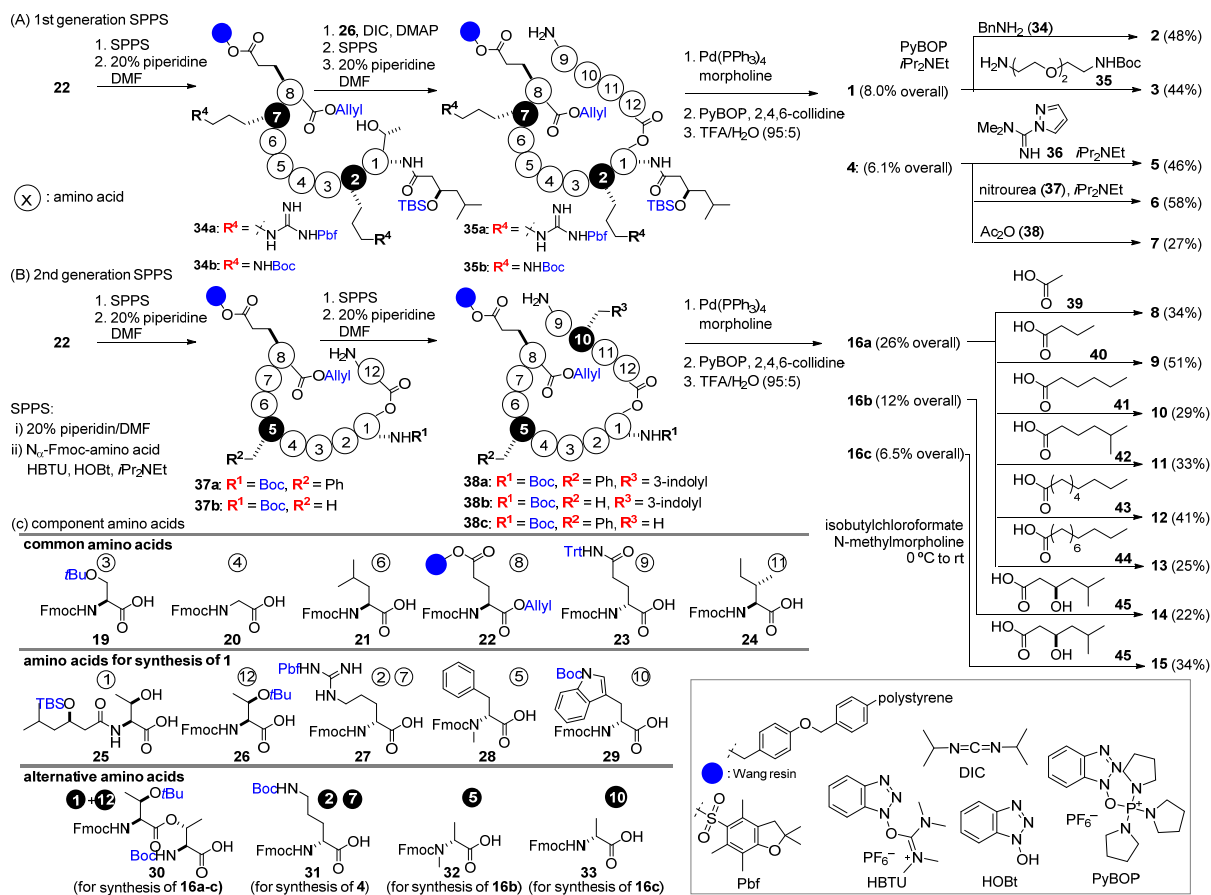


Figure 2. Solid-phase peptide syntheses of 1, 4, and 16a-c, synthesis of 2, 3, and 5-15, and component amino acids 19-33.

続いて加治は、MK 選択的ナリポソーム破壊活性および黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性試験により、**1** およびその類縁体の機能を統一的に評価した。MK 選択的な膜破壊活性を細菌膜を模倣した系で評価するために、1.25 mol% の MK-4 (**16**) または UQ-10 (**17**) と EYPC / EYPG (1:1) で構成されるリポソームを調製した。カルボキシフルオレセイン(CF)を蛍光指示薬としてリポソームに封入し、**1-15** によって生じた膜破壊活性を、放出された CF 分子が希釈されることによる蛍光増大によって評価した。

その結果、大部分の類縁体において **17** を含むリポソームに対する選択的な膜破壊活性が観測された。天然物である **1** は、2.5 μM において 62% の膜破壊活性および 4 $\mu\text{g/mL}$ の MIC を示した。カルボン酸を中性のアミドに変換した **2** および **3** においては、膜破壊活性(**2**: 64%、**3**: 93%)および抗菌活性(MIC **2**: 4 $\mu\text{g/mL}$ 、**3**: 2 $\mu\text{g/mL}$)は低下しなかった。また、塩基性のグアニジン部分を同じく塩基性のアミン(**4**)またはジメチルグアニジン(**5**)に置換すると、膜破壊活性(**4**: 62%、**5**: 55%)および抗菌活性(MIC **4**, **5**: 4 $\mu\text{g/mL}$)を維持することが明らかになった。一方、中性のウレア(**6**)およびアミド(**7**)体では、膜破壊活性(**6**: 7.4%、**7**: 0%)および抗菌活性(MIC **6**: 8 $\mu\text{g/mL}$ 、**7**: 16 $\mu\text{g/mL}$)の低下が見られ、塩基性側鎖の重要性を示唆した。C2-(**8**)、C4-(**9**)、C6-(**10**)、C7-(**11**)および C9-(**12**)の脂肪酸鎖類縁体は、いずれも同様の膜破壊活性(**8**: 51、**9**: 48、**10**: 65、**11**: 62、**12**: 42%)を示したが、C11 の脂肪酸鎖類縁体 **13** は、より低い膜破壊活性(20%)を示した。リポソーム実験においては顕著な差は見られなかったものの、脂肪酸鎖の炭素鎖長は、抗菌活性に影響した(MIC **9-12**: 2-4 $\mu\text{g/mL}$ 、**8**: 16 $\mu\text{g/mL}$ 、**13**: 32 $\mu\text{g/mL}$)。これらの結果は、高い抗菌活性発現に C4-C9 の炭素鎖が重要であることを示唆した。ベンゼン環除去体 **14** は膜破壊活性(10 μM : 65%)および抗菌活性(MIC 8 $\mu\text{g/mL}$)の低下を示すに留まった一方、インドール環除去体 **15** においては膜破壊活性(10 μM : 0%)および抗菌活性(MIC >128 $\mu\text{g/mL}$)が完全に失われた。この結果は **1** のインドール環が、MK 選択的な膜破壊活性および抗菌活性の発現に、最も重要な部分であることを強く示唆した。

さらに加治は、One-Bead-One-Compound (OBOC) 戦略をライソシン E に適用することで、評価対象となる類縁体の数を飛躍的に増大し、より網羅的な構造活性相関研究を実施することを計画した。すなわち、4箇所のアミノ酸残基(l-Ser-3、l-Leu-6、d-Gln-および l-Ile-11)を側鎖置換基の物性に基づく7種類のアミノ酸 (Val、Orn、Asp、Asn、Ser、Tyr および Ala) にランダム置換する split-pool 合成を行い、樹脂に結合した 2,401 種類のライソシン E 類縁体ライブラリを作成した。樹脂上の類縁体の MK 親和性を評価する方法として、樹脂に吸着される MK を蛍光によって定量する方法を確立した。さらにビーズから切り出したペプチドに対する液相での機能評価として、1粒のビーズに由来する類縁体の抗菌活性評価および MS/MS フラグメント解析による構造決定法を確立した。現在加治は、合成した類縁体ライブラリについて機能評価実験を進めている。

以上のように加治拓哉は、14 種類の **1** 側鎖構造類縁体を、主鎖の固相合成および液相での化学選択的な1工程変換により合成し、塩基性のグアニジン、疎水性の脂肪

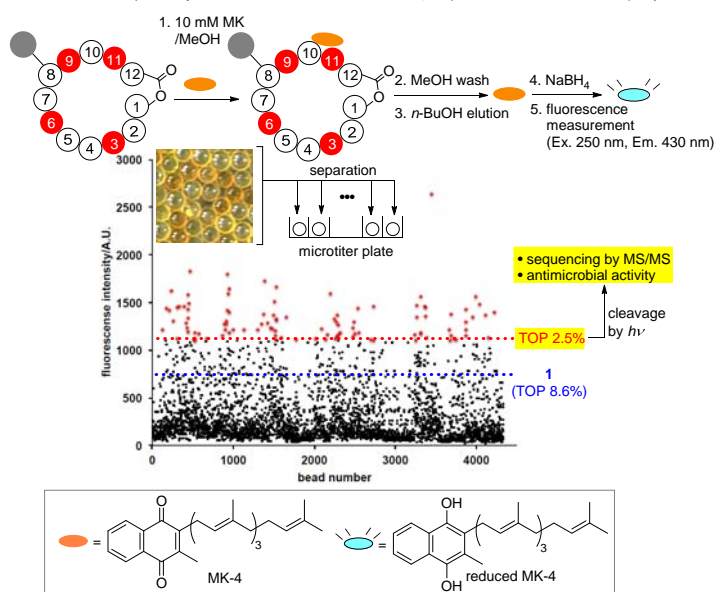


Figure 3. On-bead MK-adsorption assay of OBOC library of **1**.

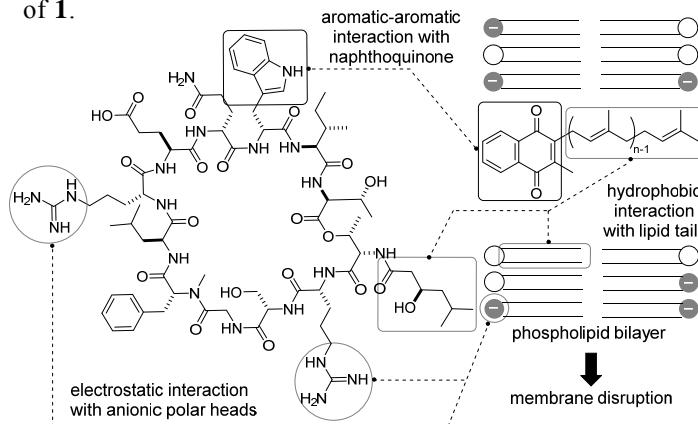


Figure 4. Hypothetical mechanism of action of **1**.

酸鎖およびインドール環が **1** の高い抗菌活性発現に重要な側鎖官能基であることを明らかにした。これらの結果は、**1** が以下のような作用機序で抗菌活性を発現することを示唆する。すなわち、**1** の塩基性のグアニジン部分および疎水性の脂肪酸鎖が、細菌リン脂質の酸性極性頭部または疎水性脂肪酸鎖とそれぞれ相互作用することで、細菌細胞膜と強く相互作用する。細菌細胞膜において、MK の電子不足なナフトキノン環と **1** の電子豊富なインドール環が芳香環相互作用を生じることで選択的に相互作用し、**1**-MK 複合体を形成する。最後に、複合体の形成により膜傷害および細胞死が引き起こされる(Figure 4)。また加治は、ビーズ上でのメナキノン親和性の蛍光による定量評価法および液相での抗菌活性測定、MS/MS による構造決定条件を確立し、2,401 種類の **1** 類縁体からなる OBOC ライブラリの設計と合成を行った。これらの成果は、薬学研究に寄与するところ大であり、博士(薬科学)の学位を授与するに値するものと認めた。