## 創薬リード開発を目指した生物活性天然物の変換研究

北海道大学 大学院薬学研究院

市川 聡

## 1. はじめに

医薬品開発に於いては、疾患ターゲットに作用する優れた化合物の取得がその成 否を分けることから、リード化合物の選択はきわめて重要である。様々な生物活性 を指標に発見されてきた天然物は、重要な創薬リード分子である。2011年までの30 年間に FDA (アメリカ食品医薬品局) に承認された医薬品 1355 個のうち、半数近く が天然物に関連しており、医薬品の「原石」と言ってよい<sup>1)</sup>。一方で、天然物そのも のが医薬品となるケースはわずか数%にすぎないのも事実であり、「原石」を「創薬 リード」とするためには、生物活性の増強・標的に対する選択性の向上・代謝安定性 の付与・体内動態の向上・毒性の低減などの様々な性質を改善する必要がある。その ためには、天然物が有する化学構造の改変が必要である。有機合成による完全化学 合成法は、より柔軟かつ広範な分子設計を可能とする。しかし、低分子化合物と比較 すると、複雑な化学構造を有する天然物誘導体を合成するためには、合成にかかる 工程数と付随する単離・精製や構造決定過程が煩雑で人的・時間的・金銭的コストが かかる。必要な天然物誘導体を「いかにして論理的に設計するか?」は、天然物創薬 における命題である。我々は、有用な生物活性を持つ天然物の全合成を研究のスタ ートラインとして位置付け、さら創薬研究へ展開してきた。本講演では、我々が取り 組んできた生物活性天然物の変換研究の成果について紹介する。

## 2. 抗がん剤リードとしてのシリンゴリン類

シリンゴリン A(Figure 1)は、Pseudomonas syringae pv Syringae が産生する植物毒素 として単離された化合物であり、抗がん剤開発の標的の一つであるプロテアソーム のトレオシン残基と反応する事で、不可逆的な阻害活性を示す<sup>2)</sup>。共有結合型阻害剤 は、標的酵素と安定な共有結合を形成することで標的を不活性化する薬剤で、低濃

度で高い阻害活性を示すことや、 活性持続時間が長く頻繁な薬剤 の投与を必要としないといった 利点を有しており、近年その選択 性と反応性を制御した創薬研究 が盛んに行われている。通常、中 性条件下では起きにくいα,β-不 飽和カルボキサミドに対する水 酸基のMichael付加が起きている 事に興味をもった。



Figure 1. Structure and inhibitory mechanism of syringolin A

まず我々は、ホルミルイソニトリルを用いた Ugi-3 成分環化反応により、非天然ア ミノ酸である 3,4-デヒドロリシンの構築とともに、12 員環ラクタムの形成と側鎖部 のウレアジペプチドの導入を合成の終盤に一挙に達成する事で、シリンゴリン A の 全合成を行った (Scheme 1)<sup>3)</sup>。





シリンゴリン A のプロテアソーム阻害活性と細胞増殖抑制活性は極めて弱い。次 に、作用機構と構造に基づいた理論的な活性の増強を図った(Figure 2)。シリンゴリ ン A とプロテアソームの複合体の X 線共結晶構造<sup>2)</sup>から、側鎖部 12 員環側バリン 残基は、大きな疎水性の S3 ポケットと疎水性相互作用をしていることに着目し、バ リン残基の最適化を行った結果、プロテアソームβ5 サブユニットに対する阻害活性 を増強する事ができた(誘導体 1)。さらに膜透過性を向上させることで、強力なβ5 サブユニット阻害活性(シリンゴリン A の約 4900 倍強い活性)とヒト癌細胞に対す る細胞増殖抑制活性(シリンゴリン A の約 500-750 倍強い活性)を有し、骨髄腫皮 下移植モデルマウスに対しても抗腫瘍活性を有する化合物 2 を見出した<sup>4.5)</sup>。



Figure 2. Improvement of biological activity of syringolin A

共有結合型阻害剤は、平衡定数 Ki で示される非共有結合型複合体の形成段階と、 反応速度定数 k2 で示される共有結合形成段階の2段階の機構を経て標的と結合する。 シリンゴリン類のような、母骨格内に求電子性官能基を含有する共有結合型阻害剤 は一般に、Ki と k2 の両方が環配座に依存するために各段階と配座の相関を得ること が難しく、これまでに配座活性相関研究が行われた例は無い(Figure 3b)。我々は、 共有結合型阻害剤の論理的な分子設計指針を得るべく、誘導体 1 の環サイズやアル

ケンの位置・有無を変えたシリンゴ リン誘導体群を構築し、これらのプ ロテアソーム阻害活性に関する速 度論解析を行うことで、環配座と Ki、k2の相関を検討した(Figure 4) <sup>67)</sup>。その結果、側鎖部の構造と環状 部の配座はプロテアソームとの共 有結合形成前の非共有結合形成段 階に大きく影響を与え、環状部の歪



Figure 3. Two types of covalent inhibitors. a) warhead-type covalent inhibitor, b) embedded-type inhibitor.



Figure 4. Kinetic analysis of syringolin analogues

みの大きさが共有結合形成の速度に関わることが示唆された。以上の速度論解析結果に基づいて、最も k2 の高い誘導体に対してさらに親和性の高い側鎖部の導入を行い、高活性な誘導体を見出すこともできた。本研究成果は共有結合性阻害剤の論理的な薬物設計に必要な情報を得る手法として有用であると考えられる。

3. 抗薬剤耐性菌薬リードとしてのヌクレオシド系天然物

抗生物質を用いる感染症治療には常に薬剤耐性菌の出現が伴うが、既存の薬が全 く効かない超薬剤耐性菌の出現とその蔓延は地球規模の極めて深刻な問題である。 細菌の細胞壁ペプチドグリカン生合成は抗菌開発の良いターゲットである。この生 合成酵素の一つで、UDP-GlcNAc-ペンタペプチドから細胞膜上への糖ペプチドの転 移反応を触媒する転移酵素 MraY は、すべての細菌の生育に必須な酵素である。こ の新規ターゲットを阻害する天然物として、カプラザマイシン・ムライマイシン・ツ ニカマイシン・パシダマイシン等に代表されるヌクレオシド系天然物が知られてい る<sup>®</sup>。カプラザマイシン類(Figure 5)は、結核菌に対して抗菌活性を示すばかりで なく、薬剤耐性結核菌に対しても活性なこと、*in vivo*毒性試験においてもほとんど 毒性が認めらないことから新規抗結核薬開発のリードとして期待されている<sup>®</sup>。ム ライマイシン類(Figure 5)も、グラム陽性菌に有効である<sup>10</sup>。これらの天然物はウ リジン・グリシン・アミノリボースを含む共通構造 A を有しており、Mra Y 阻害活 性発現に必須な構造であると考えられる。我々はこの共通構造の構造構築を基軸と した合成研究を行うこととし、まずカプラザマイシン類のコア構造であるカプラゾ ールの全合成を行った。

まず、化合物3のSharplessアミノヒドロキシル化よって得た化合物4の5/位水酸



Figure 5. Structure of caprazamycins and muraymycins

Scheme 2. Total synthesis of caprazol and its analogues



基へのアミノリボースの導入を検討した(Scheme 2)。グリコシル化反応によりβ-グ リコシドを構築するためには、アシル基の隣接基関与を用いるのが一般である。し かしながら、カプラザマイシン類は塩基性条件下で容易に分解するため、アシル基 の脱保護の際に問題を生じる可能性が高い。我々は酸性条件で脱保護可能な 3-ペン チリデン基で保護したリボース誘導体 5 を用いる事で、α面に存在する保護基の嵩高 さによりβ面選択的に求核剤が反応し、高選択的にβ-リボシド6を与える(β/α比 24/1) 条件を見出した<sup>11)</sup>。β-リボシド6の官能基と保護基を適切に変換して環化前駆体で ある化合物 8 へ導いた。化合物 8 の Cbz 基を接触水素添加にて除去後、分子内還元 的アミノ化を行った結果、目的とするジアゼパノン体 9 が得られた。ジアゼパノン 部窒素のメチル化を行い、最後に含水トリフルオロ酢酸ですべての保護基を脱保護 することで(+)-カプラゾールの初の全合成を達成した<sup>12)</sup>。また、カプラザマイシン類 が有する脂溶性側鎖を単純なパルミトイル基へ変換した誘導体である 10 を合成し、 本化合物が天然物と同等の MraY 阻害活性と抗菌活性を有する事や<sup>13)</sup>、活性に必要 な部分構造を抽出した単純化誘導体 11<sup>14)</sup>や12<sup>15)</sup>もバンコマイシン耐性菌に対して抗 菌活性を有する事も明らかにした。

ムライマイシンも共通構造 A から合成できる。将来的な構造活性相関研究を見据 えて、多成分反応の一つである Ugi-4 成分反応を合成過程に用いる事を計画した (Scheme 3)。化合物 13 から調製したホルムアミド体 15 をトリホスゲンで脱水する 事で得たイソニトリル 16 を、非天然アミノ酸である L-epi-カプレオミシジンを含む ウレアジペプチドカルボン酸 17、2,4-ジメトキシベンジルアミン(18)、イソバレル アルデヒド(19)と混合したところ、Ugi-4 成分反応成績体 20 が Leu 部のジアステ レオ混合物として得られた(ジアステレオ比 1:1)。最後に脱保護を行い、ムライマ イシン D2 とそのエピマーの全合成を達成した<sup>16)</sup>。Ugi-4 成分反応は、多彩な官能基 を有するヌクレオシド系天然物の収束的合成には好都合である。すなわち、標的化 合物の合成の終盤に多成分反応を設定した場合、各ユニットを組みかえることで

Scheme 3. Total synthesis of muraymycin D2



様々な多様性を持つ誘導体を迅速に供給することが可能である。本全合成経路を用いる事で、ムライマイシン D2 の構造活性相関を迅速に検討する事が出来、①脂溶性 側鎖は MraY 阻害活性には必要ではないが抗菌活性を示すのに必須である事、②Lepi-カプレオミシジンを含むウレアジペプチド部は MraY 阻害活性・抗菌活性ともに 不要であることがわかり、生物活性を保持しつつ化学構造を単純化する事が出来た (Figure 6, 21)<sup>17,18)</sup>。本化合物を基盤として、グラム陰性菌である緑膿菌にも活性 を示す誘導体 22 を見出す事も出来た<sup>19)</sup>。





また、我々が化学合成したムライマイシン D2 と Aquifex aeolicus 由来 MraY との X線結晶構造解析に成功した(Figure 7)<sup>20)</sup>。apoMraY との比較検討から、ムライマ イシン D2 の結合に合わせて MraY は非常に大きな構造変化を起こし、apoMraY で は散在していた 4 つのアミノ酸残基が寄り集まることでムライマイシン D2 のウラ シル部位を認識するポケットが新たに生じることが明らかとした。これは apoMraY の構造だけでは全く予想できなかった現象で、複合体の構造解析を行うことで初め て見出すことができた。現在、本複合体の構 造に基づいた理論的な薬物設計を展開してい る。

4. おわりに

天然物そのものを医薬品にする事は難しく、 天然物に分子設計を施すことでより薬らしい 分子へ進化させる事は、我々創薬化学者が果た すべき使命であると考えている。自然から享受 された「天然物」に「創薬化学」という人智を 付与する「天然物創薬化学」を進める事で、創 薬リード創出を実現したいと考えている。



- 1. Newman, J. Nat. Prod. 2012, 75, 311.
- 2. Groll, M.; Schellenberg, B.; Bachmann, A. S.; Archer, C. R.; Huber, R.; Powell, T. K.; Lindow, S.; Kaiser, M.; Dudler, R. *Nature* **2008**, *452*, 755.
- 3. Chiba, T.; Hosono, H.; Nakagawa, K.; Asaka, M.; Takeda, H.; Matsuda, A.; Ichikawa, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4836.
- Yoshida, T.; Ri, M.; Kanamori, T.; Aoki, S.; Ashour, R.; Kinoshita, S.; Narita, T.; Totani, H.; Masaki, A.; Ito, A.; Kusumoto, S.; Ishida, T.; Komatsu, H.; Kitahata, S.; Chiba, T.; Ichikawa, S.; Iida, S. *Oncotarget* 2018, *9*, 9975.
- 5. Chiba, T.; Matsuda, A.; Ichikawa, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, 25, 4872.
- Kitahata, S.; Chiba, T.; Yoshida, T.; Ri, M.; Iida, S.; Matsuda A.; Ichikawa, S. Org. Lett. 2016, 18, 2312.
- 7. Kitahata, S.; Yakushiji, F.; Ichikawa, S. Chem. Sci. 2017, 8, 6959.
- 8. Ichikawa, S.; Yamaguchi, M.; Matsuda, A. Current Med. Chem. 2015, 22, 3951.
- 9. Igarashi, M.; Nakagawa, N.; Doi, N.; Hattori, S.; Naganawa, H.; Hamada, M. J. Antibiot. 2003, 56, 580.
- 10. McDonald, L. A.; Barbieri, L. R.; Carter, G. T.; Lenoy, E.; Lotvin, J.; Petersen, P. J.; Siegel, M. M.; Singh, G.; Williamson, R. T.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10260.
- 11. Ichikawa, S.; Hayashi, R.; Hirano, S.; Matsuda, A. Org. Lett. 2008, 10, 5107.
- 12. Hirano, S.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 1854.
- 13. Hirano, S.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. J. Org. Chem. 2008, 73, 569.
- 14. Ii, K.; Ichikawa, S.; Al-Dabbagh, B.; Bouhss, A.; Matsuda, A. J. Med. Chem. 2010, 53, 3793.
- 15. Tanino, T.; Yamaguchi, M.; Matsuda, A.; Ichikawa, S. Eur. J. Org. Chem. 2014, 1836.
- 16. Tanino, T.; Ichikawa, S.; Shiro, M.; Matsuda, A. J. Org. Chem. 2010, 75, 1366.
- 17. Tanino, T.; Ichikawa, S.; Al-Dabbagh, B.; Bouhss, A.; Matsuda, A. ACS Med. Chem. Lett. 2010, 1, 258.
- 18. Tanino, T.; Al-Dabbagh, B.; Mengin-Lecreulx, D.; Bouhss, A.; Oyama, H.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. J. Med. Chem. 2011, 54, 8421.
- Takeoka, Y.; Tanino, T.; Sekiguchi, M.; Yonezawa, S.; Sakagami, M.; Takahashi, F.; Togame, H.; Tanaka, Y.; Takemoto, H.; Ichikawa, S.; Matsuda. A. ACS Med. Chem. Lett. 2014, 5, 556.
- Chung, C. B.; Mashalidis, H. E.; Tanino, T.; Kim, M.; Matsuda, A.; Hong, J.; Ichikawa, S.; Lee, S.-Y. *Nature*, 2016, *533*, 557.



Figure 7. Structure of  $\rm MraY_{AA}$  bound to muraymycin D2