

# 論文要旨

## 天然環状ペプチド オギペプチン及びその誘導体の合成研究

令和4年度

第一三共 RD ノバーレ(株) 合成化学研究部 探索合成グループ

滝口 真伍

### 【背景・目的】

多剤耐性グラム陰性菌の増加とその感染症への対策が世界中で重要な課題となっており、新しい抗菌薬の開発が期待されている。コリスチン(ポリ

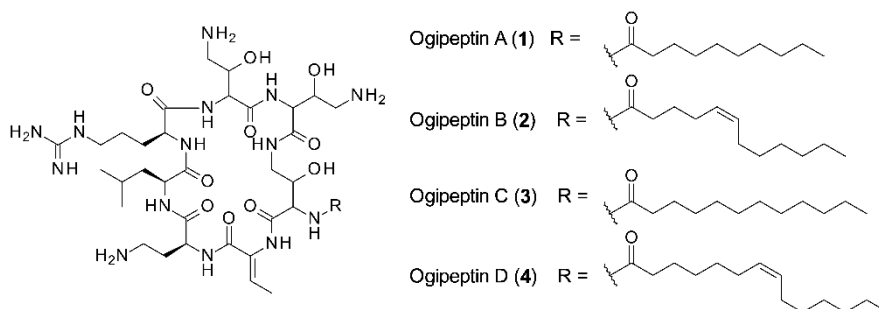


Figure 1 Structures of ogipeptins A, B, C, and D

ミキシシ E)は、福島県掛田町の土壌から発見された天然環状ペプチドであり、1951年に硫酸コリスチンの形で抗菌薬として発売されたが、重篤な腎機能障害や神経障害などの副作用が原因で一度は承認が取り消された薬剤である。しかし、多剤耐性グラム陰性菌が世界中で蔓延しつつある状況を受けて、日本では2015年に再承認され、現在では多剤耐性グラム陰性菌感染症に対して“最後の切り札”となる抗菌薬として使用されている。

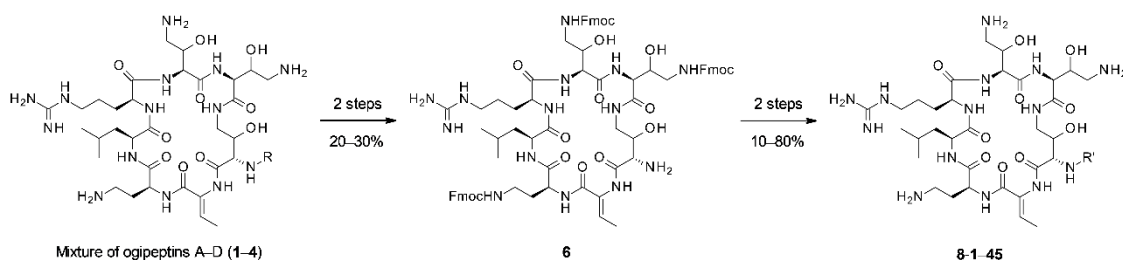
オギペプチン A, B, C, D は第一三共株式会社における創薬研究で、海洋細菌 *Pseudoalteromonas* 属から単離・構造決定された天然の環状ペプチドである (Figure 1)。オギペプチンはグラム陰性菌に対して抗菌活性を示すことが確認されており、また環状ペプチド骨格からアシル側鎖が伸びたリポペプチド構造と、複数の塩基性アミノ酸残基の存在がポリミキシシシ類の構造的特徴と類似していることから、新しい抗菌薬のリード化合物になりうると考えられた。そこで本研究では、オギペプ

チンをリード化合物として、先行薬であるコリスチンより副作用が少なく、かつ十分な抗菌活性を有する新規抗菌薬を創製することを目的に、新規誘導体の合成やオギペプチン A の全合成研究を行った。

### 【方法・結果】

ポリキシン類の推定作用メカニズムから、オギペプチンも同様にそのアシル側鎖がグラム陰性菌の細胞壁を構成する lipopolysaccharides の Lipid A 部分と相互作用することで、抗菌活性を示していることが推測された。そこで、オギペプチンのアシル側鎖を様々な構造に変換した新規誘導体をデザイン・合成し、それらの抗菌活性と腎毒性を評価することとした。

まず、オギペプチン生産菌株の Jar 培養により得たオギペプチン A-D を含む粗生成物を原料にして、塩基性側鎖の保護基の検討を行った。種々の検討の結果、収率やハンドリングの面から Fmoc 基が最良であることを見出し、続く酸加水分解によって中間体 **6** を得た。**6** に対して任意のアシル側鎖カルボン酸を縮合させた後、Fmoc 基を脱保護することで新規誘導体を合成するルートを確認した (Scheme 1)。このルートに従い、新規オギペプチン誘導体を 45 化合物合成し、それらの MIC 測定、細胞毒性評価及び腎毒性評価を実施した。その結果、ほとんどの誘導体がグラム陰性菌に対して抗菌活性を有し、中にはコリスチンと比較して格段に腎毒性が低減した化合物がいくつか発見された。しかしながら、コリスチンよりも強い抗菌活性を示す化合物を得るには至らなかった。<sup>1</sup>



Scheme 1 Synthesis of ogipeptin derivatives 8

アシル側鎖の変換だけでは大幅な活性向上は見込めないと判断し、オギペプチンの骨格自体を変換した新規誘導体の合成が必要と思われた。骨格を改変した誘導体を得るためにはペプチド固相合成 (SPPS) 法を利用した合成ルートが最良であると考えたため、まずはオギペプチンの全合成ルートの確立を目指して検討を開始した。その際に問題となったのがオギペプチンの絶対立体配置が未解明であるという点であった。オギペプチンは 7 残基のアミノ酸で構成されており、アルギニン (Arg)、ロイシン、2,4-ジアミノブタン酸 (Dab) は L 体であり、デヒドロブチリン (Dhb) の立体化学は Z 配置であることが確認されている。その一方で、3 残基の  $\beta$ -OH Dab の絶対立体配置については、生

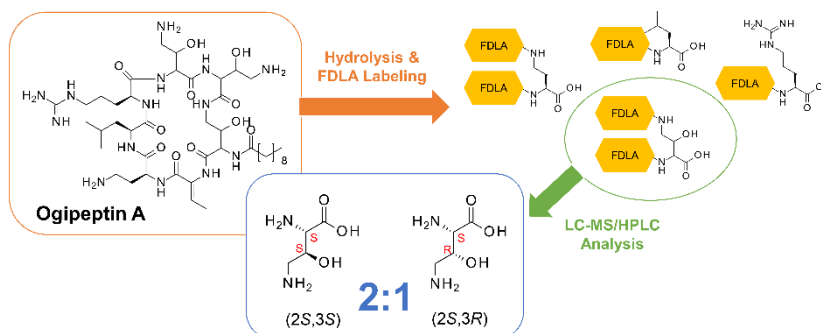
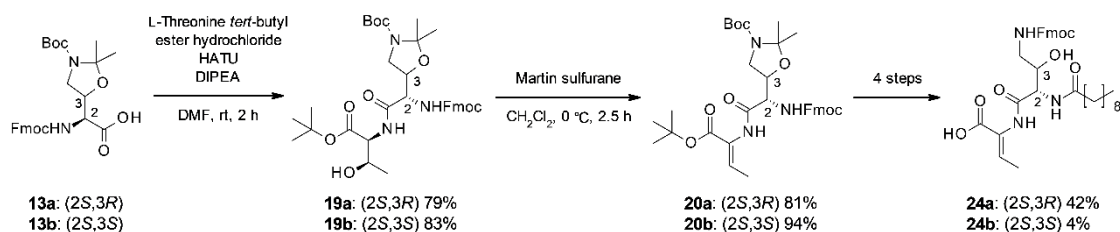


Figure 2 Application of the advanced Marfey's method to ogipeptin A

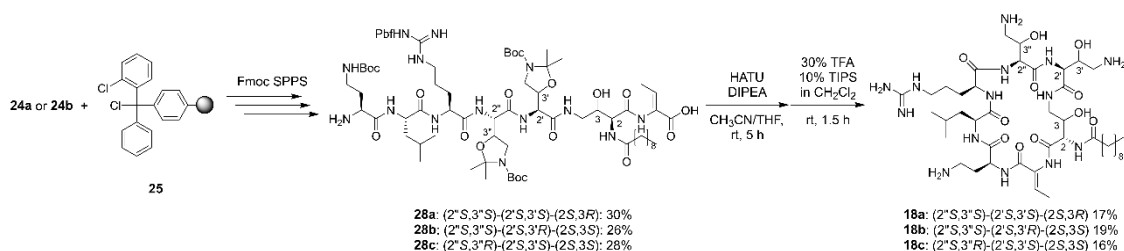
合成遺伝子解析から L 体であることは判明したものの、3 位不斉炭素の立体配置については不明であった。これを明らかにするために、X 線結晶構造解析による検討を行ったが良質な結晶は得られず、結晶化検討は断念した。そこで、別のアプローチとして改良 Marfey 法による絶対立体配置の推定を行うこととした。絶対立体配置が(2*S*,3*S*)または(2*S*,3*R*)であるβ-OH Dab の保護体 2 種(Scheme 2 の **13a**, **b**)を合成し、これらとオギペプチン A の天然サンプルを使用して改良 Marfey 法を行った。LC-MS 解析の結果、オギペプチン中のβ-OH Dab は絶対立体配置が(2*S*,3*S*)と(2*S*,3*R*)のものが 2:1 の比率で存在していることが明らかになった(Figure 2)。<sup>2</sup>

この結果からオギペプチンの絶対立体配置を推定し、考えられるジアステレオマーを実際に合成し、その機器分析データを天然物標品と比較することで絶対立体配置を解明することとした。SPPS に用いる Fmoc アミノ酸ブロックとして、中間体 **24a**, **b** をデザインした(Scheme 2)。Dhb の構造は通常、スレオニン(Thr)から脱水反応によって導く手法が考えられるが、全合成の終盤では 3 残基のβ-OH Dab が共存する中で選択的に Thr を脱水させるのは困難であることが予想された。加えて、隣接するβ-OH Dab 残基は側鎖のアミノ基が環骨格に含まれるという特殊な構造を取っていることから、予めこの 2 残基をジペプチドブロックとして合成しておき、それを固相合成に用いることとした。化合物 **13a**, **b** に対して Thr の保護体を縮合させてジペプチド **19a**, **b** を得た。続く Thr 部位の脱水反応では、ヒドロキシ基を脱離基に修飾した上で、塩基性条件で脱水させる手法を種々検討したが Fmoc 基が脱保護される副反応等が影響し、低収率か全く反応が進行しない結果となった。そこで中性条件で進行する脱水試薬としてマーティンスルフランを試したところ、高収率で脱水体 **20a**, **b** が得られた。その立体が *Z* 配置であることは NMR 測定の各種解析手法によって確認した。**20a**, **b** から 4 工程で目的の **24a**, **b** に導くことに成功したので、SPPS に着手した。



Scheme 2 Synthesis of intermediates **24a** and **24b**

レジンには保護ペプチドの固相合成でよく用いられる Cl-Trt(2-Cl)-resin **25** を選択した。このレジンに中間体 **24a**, **b** をそれぞれローディングし、Fmoc 法 SPPS を行い鎖状保護ペプチド **28a**, **b**, **c** に誘導した後、環化、アミノ酸側鎖の脱保護を経てオギペプチン A として可能性のある 3 種のジアステレオ



Scheme 3 Synthesis of three diastereomers of ogipeptin A by SPPS, macrocyclization, and deprotection

マー**18a, b, c**を得た (Scheme 3)。これらと天然物標品を HPLC 分析と NMR 測定で比較したところ、**18a** が天然物と完全に一致する HPLC チャート、NMR スペクトルを示した。これにより、オギペプチン A の絶対立体配置が **18a** の構造であることが明らかとなり、さらに SPPS によるオギペプチン A の全合成ルートを確立することに成功した。<sup>3</sup>

更に、この固相全合成ルートをベースにして、骨格改変型の新規オギペプチン誘導体の合成にも着手した。抗菌薬としてオギペプチン誘導体を大量に製造することを考えた際に、 $\beta$ -OH Dab のヒドロキシ基の存在や Dhb の構造はコスト的に大きな問題となる。そこで、 $\beta$ -OH Dab を Dab に、Dhb をグリシンなどのアミノ酸残基に置換する検討を行った。また、オギペプチンに存在する Arg 残基は塩基性が高いため、別のアミノ酸残基に変換することで活性の向上や腎毒性の軽減が期待できると考えた。したがって、① $\beta$ -OH Dab の Dab への変換、②Dhb の変換、③Arg の変換、の 3 点に主眼を置き、それらの誘導体の合成を

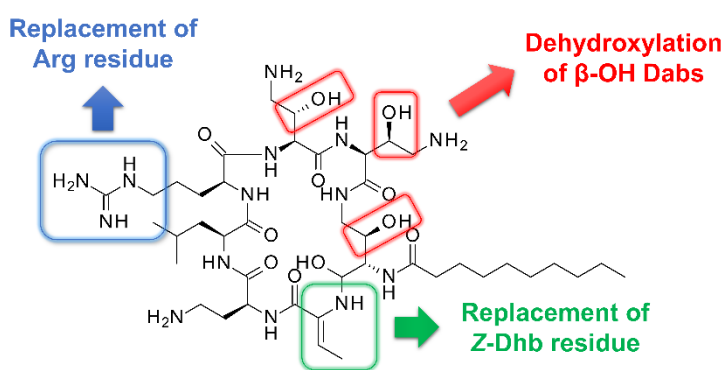


Figure 3 Synthetic designs for novel ogipeptin derivatives

行った (Figure 3)。Scheme 2 の全合成ルートで用いるジペプチドブロックと使用する Fmoc アミノ酸を変更した方法で、骨格改変型の新規オギペプチン誘導体を 8 化合物合成した。<sup>4</sup>

#### 【結語】

本研究において、筆者はオギペプチンのアシル側鎖変換型誘導体 45 化合物の合成に成功し、その中からグラム陰性菌に対してコリスチンとほぼ同等の抗菌活性を有し、コリスチンと比べて腎毒性が格段に低減した化合物を獲得した。さらに、オギペプチン A への改良 Marfey 法の適用とオギペプチン A の全合成の達成により、それまで不明であったオギペプチンの絶対立体配置の解明に成功した。それと同時に、固相全合成手法による骨格改変型オギペプチン誘導体の合成ルートを確立し、新規誘導体 8 化合物の合成を達成した。以上の研究成果は、コリスチンに代わる多剤耐性グラム陰性菌に対する新規抗菌薬の開発に大きく貢献するものと考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) Takiguchi, S.; Homma, H.; Fujisawa, T.; Hirota-Takahata, Y.; Ono, Y.; Kizuka, M.; Ishii, Y.; Yoshimura, S.; Nishi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *42*, 128093. [IF: 2.823]
- 2) Takiguchi, S.; Hirota-Takahata, Y.; Nishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2022**, *96*, 153760. [IF: 2.415]
- 3) Takiguchi, S.; Hirota-Takahata, Y.; Nishi, T. *Org. Lett.* **2022**, *24*, 4935. [IF: 6.005]
- 4) Takiguchi, S.; Nishi, T. *Synlett* **2023**, *34*, 277. [IF: 2.454]