

抗感染症薬創製を指向した微生物由来生物活性天然物の合成と機能解明  
 感染制御科学専攻・生物有機化学  
 DI-20001 金井田 将裕

1.  $\beta$ -ラクタム薬耐性克服活性を示す Hymeglusin および Fusarilactone A の不斉全合成と機能解明

【背景】

Methicillin-Resistant-*Staphylococcus aureus* (MRSA)

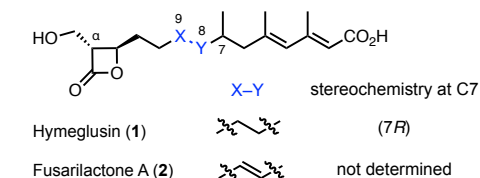
は、1960 年代に初めて確認された  $\beta$ -ラクタム薬耐性菌であり、院内感染型(Hospital acquired MRSA)のみならず、市中感染型(Community acquired MRSA)も報告され猛威を奮っている。一方で、このような薬剤耐性菌に対する有効なアプローチとして“薬剤の併用療法”が挙げられる。本治療法は複数の薬剤によって治療を行うため、耐性菌の出現を抑制する効果が期待される。そこで大村智記念研究所において、微生物培養液から、 $\beta$ -ラクタム薬である Meropenem (MEPM)との併用処理により、MRSA の薬剤耐性を克服する活性物質の探索スクリーニングが実施された。その結果、糸状菌

*Fusarium falciforme* FKI-8363 株より Hymeglusin (1)<sup>1)</sup>とその C8-C9 位が酸化された Fusarilactone A (2)<sup>2)</sup> (Fig. 1)が MEPM 耐性克服活性を示すことが見出された。

**1** は哺乳類および細菌の HMG-CoA synthase (mvaS)阻害活性により有望な脂質合成阻害剤の候補化合物として広く研究されてきた天然物である<sup>3)</sup>。そこで演者は **1** と **2** の有する  $\beta$ -ラクタム薬耐性克服活性と mvaS 阻害活性の関連性を明らかにする目的で、誘導体創製を指向した効率的な  $\beta$ -ラクトン天然物群の合成経路の確立、mvaS 過剰発現株を利用した推定作用機序の検証を行なうこととした。

【 $\beta$ -ラクトン天然物群の不斉全合成】

**1** および **2** は、4 員環という不安定な  $\beta$ -ラクトン構造を共通して有するため適用できる天然物の化学修飾に制限がある。そこで演者は、**2** の初の不斉全合成および絶対立体構造の決定と **1** の不斉全合成を行った(Scheme 1)。はじめに **5** を不斉触媒とした型式 [2+2]環化付加反応によって **6**<sup>4)</sup>を調製し(91% ee)、TMS 基の導入に続く無水条件下での脱シリル化に伴う aldol 反応によってヒドロキシメチル基を立体選択的に導入した。続いてシリル保護によって得た **9** をオゾン分解によって **10** を合成した。一方で **11** の合成については、(R)-Roche エステルから導ける **12**<sup>5)</sup>から **13** との鈴木-宮浦カップリングによって共役ジエンを構築し、反応の後処理に TBAF を加えることでワンポットにて **14** へと導いた。続いて **15** との光延反応によってスルフィドとしたのちにモリブデン触媒を用いて酸化することで **11** の合成を行った。上述の合成経路にて調製した **10** に対し **11** を用いた Julia-Kocienski カップリングを適用したところ、反応は速やかに進行し、基本炭素骨格の構築を 94%と高収率にて実現した。そして酸性



MRSA Strain	MIC ( $\mu$ g/mL)		MIC ( $\mu$ g/mL)
	MEPM	1	MEPM + 1*
92-1191	128	2	<b>0.125</b>
ATCC 33591	16	2	<b>0.125</b>
KUB 2750	4	2	<b>0.015</b>

\* Dose of **1** was fixed (0.5  $\mu$ g/mL)

Fig. 1 Hymeglusin (1)とFusarilactone A (2)の化学構造と生物活性

**Scheme 1** Hymeglusin (1)およびFusarilactone A (2)の不斉全合成

Reaction 1: 3 + 4  $\xrightarrow[61\%]{5, \text{LiClO}_4, \text{DIPEA}, \text{DCM}, \text{Et}_2\text{O}, -78^\circ\text{C}}$  6<sup>4)</sup> (91% ee)  $\xrightarrow[66\%]{\text{LiHMDS, TMSCl}, \text{DCM}, -78^\circ\text{C}}$  7  $\xrightarrow[43\% (2 \text{ steps})]{1) 8, \text{anhydrous TBAF, THF}, -78^\circ\text{C}; 2) \text{TBDPSCl, imidazole, DCM}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  9

Reaction 2: 9  $\xrightarrow[92\%]{\text{O}_3, \text{DCM}, -78^\circ\text{C}; \text{PPh}_3, -78^\circ\text{C to r.t.}}$  10  $\xrightarrow[94\%]{11, \text{LiHMDS, THF}, -78^\circ\text{C}}$  16 (E:Z = 1:1)

Reaction 3: 16  $\xrightarrow[40\% (\text{brsm} = 55\%)]{H_2, \text{Wilkinson's cat.}, \text{PhH}, 70^\circ\text{C}}$  18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 4: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 5: 10 + 17  $\xrightarrow[29\%]{\text{H}_2, \text{Wilkinson's cat.}, \text{PhH}, 70^\circ\text{C}}$  18

Reaction 6: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 7: 12<sup>5)</sup>  $\xrightarrow[70\%]{13, \text{Pd(dppf)Cl}_2 \cdot \text{DCM}, \text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}, \text{DMF}, \text{r.t.}; \text{TBAF}, \text{r.t.}}$  14  $\xrightarrow[93\%]{1) 15, \text{PPh}_3, \text{DEAD}, \text{THF}, 0^\circ\text{C}, 90\%; 2) \text{Mo}_7(\text{NH}_4)_6\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}, \text{H}_2\text{O}_2, \text{EtOH}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  11 (gram scale)

Reaction 8: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 9: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 10: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 11: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 12: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 13: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 14: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 15: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 16: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 17: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 18: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 19: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 20: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 21: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 22: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 23: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 24: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 25: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 26: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 27: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 28: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 29: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 30: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 31: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 32: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 33: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 34: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 35: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 36: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 37: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 38: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 39: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 40: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 41: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 42: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 43: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 44: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 45: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 46: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 47: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 48: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 49: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 50: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 51: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 52: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 53: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 54: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 55: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 56: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 57: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_2CO_3, \text{MeOH}, \text{r.t.}}$  1

Reaction 58: 18  $\xrightarrow[41\%, 7 \text{ steps from 3}]{50\% \text{ HF in H}_2\text{O}, \text{THF}, 0^\circ\text{C to r.t.}}$  2

Reaction 59: 18  $\xrightarrow[70\%]{K_$

mvaS と MEPM 耐性克服活性の関連性について、2016 年に関水らは、*S. aureus* においては HMG-CoA reductase (mvaA) が生育に重要であり細胞壁合成の過程に必須であることを報告している<sup>9)</sup>。そこで我々は、**1** が MRSA の生合成経路において mvaA の上流に位置する mvaS を阻害することで、MEPM と相乗効果を示していると予測した。しかしながら、**1** が MRSA において mvaS を阻害する報告はなされていない。一方で哺乳類の HMG-CoA synthase 阻害活性においては、その結合サイトが明らかとされており、<sup>129</sup>Cys のチオール基が **1** の  $\beta$ -ラクトン環と共有結合しチオエステルを形成する<sup>7)</sup>。そこで MRSA においても mvaS と **1** は同様に Cys 残基とチオエステルを形成していると推察し共同研究者によるアッセイが実施された。

Methicillin-Sensitive-*Staphylococcus aureus* (MSSA) RN 4220 株にシャトルベクターpND50 を用いて形質転換を行い mvaS 過剰発現株を調製した。加えて mvaS と **1** の結合サイトとして推定した <sup>131</sup>Cys を <sup>131</sup>Ala へと変異導入した過剰発現株も同様に調製し、抗菌活性試験を実施した。その結果、ワイルドタイプは **1** に対して感受性を示したのに対し、mvaS 過剰発現株においては 128 倍活性が減弱した。さらに mvaS/Cys111Ala 過剰発現株は **1** に対する感受

性を示したことから、**1** は菌体内においても *mvaS* に結合し、その結合サイトは  $^{111}\text{Cys}$  である事が示唆された<sup>8)</sup>。

## 【結論】

演者は MRSA における新規併用薬剤の開発を目指して、Hymeglusin (**1**) および Fusarilactone A (**2**)の不斉全

合成を達成し、**2** に関しては絶対立体構造を決定した。さらに *S. aureus* ミュータントのアッセイによって  $\beta$ -ラクタム薬耐性克服活性には *mvaS* が関係していることを強く示唆する結果を得た。

Table 1 *S. aureus* ミュータントの抗菌活性試験

Strain	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	MEPM	Hymeglusin ( <b>1</b> )
<i>S. aureus</i> RN 4220 wild type	0.015	0.25
<i>S. aureus</i> RN 4220 with overexpression of <i>mvaS</i>	0.015	32
<i>S. aureus</i> RN 4220 with overexpression of <i>mvaS</i> /Cys111Ala	0.015	0.0125-0.063

## 2. 新規 PPI 阻害剤創製を指向した中分子天然物 Dityromycin の全合成研究

### 【背景】

本研究の合成標的である Dityromycin (**19**) は、1977 年に北里研究所の大村らによって放線菌 *Streptomyces* sp. AM-2504 株より単離された中分子天然物である<sup>9)</sup>。構造的な特徴として **19** は、イソジチロシン型環状トリペプチド構造とデヒドロイソロイシン酸化型異常アミノ酸を含む大環状デプシペプチドである (Fig. 2)。単離から 45 年が経過した現在もなお、本化合物の絶対立体構造の決定はなされていない。また、その生物活性として **19** は、偏性好気性、嫌気性菌に対し、リボソーム内 S12 タンパクと結合することで、翻訳伸長因子 EF-G とのタンパク質間相互作用 (PPI)を阻害する (Fig. 3)<sup>10)</sup>。演者は **19** の全合成経路の確立と絶対立体構造の決定を目指すにあたって **19** を 3 つのフラグメントに分割した収束的な合成戦略を立案し、各々の合成法を行った(Scheme 2)。

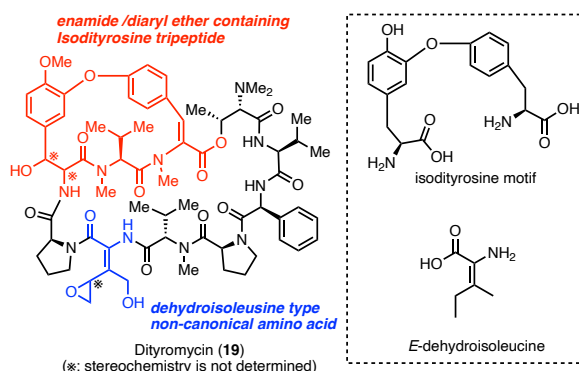


Fig. 2 Dityromycin (**19**)の化学構造

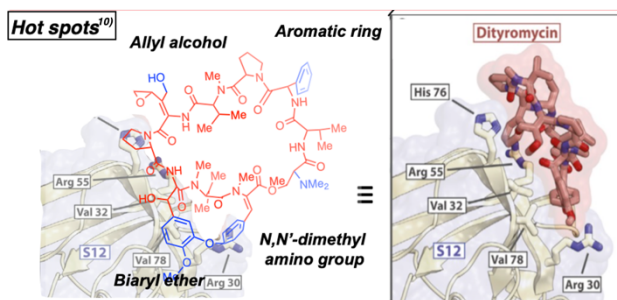
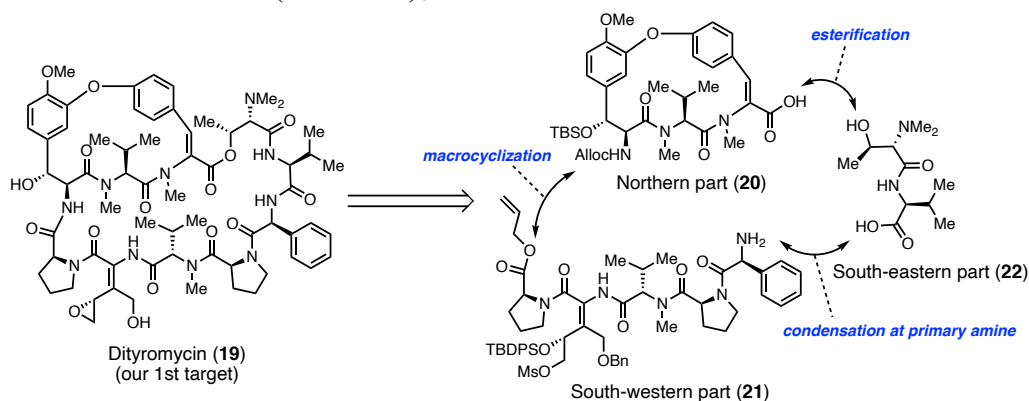


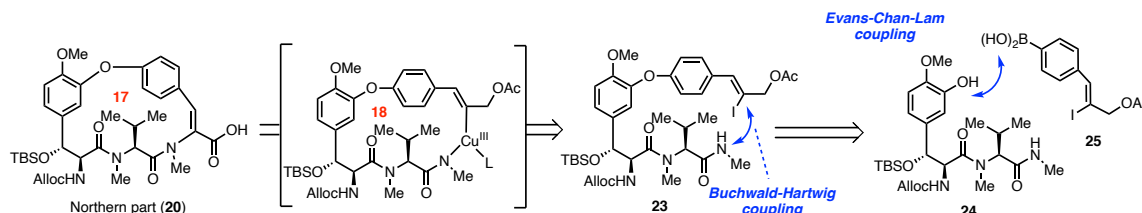
Fig. 3 Dityromycin (**19**)と S12 タンパクの X 線共結晶構造図<sup>10)</sup>



Scheme 2 Dityromycin (**19**)の合成戦略

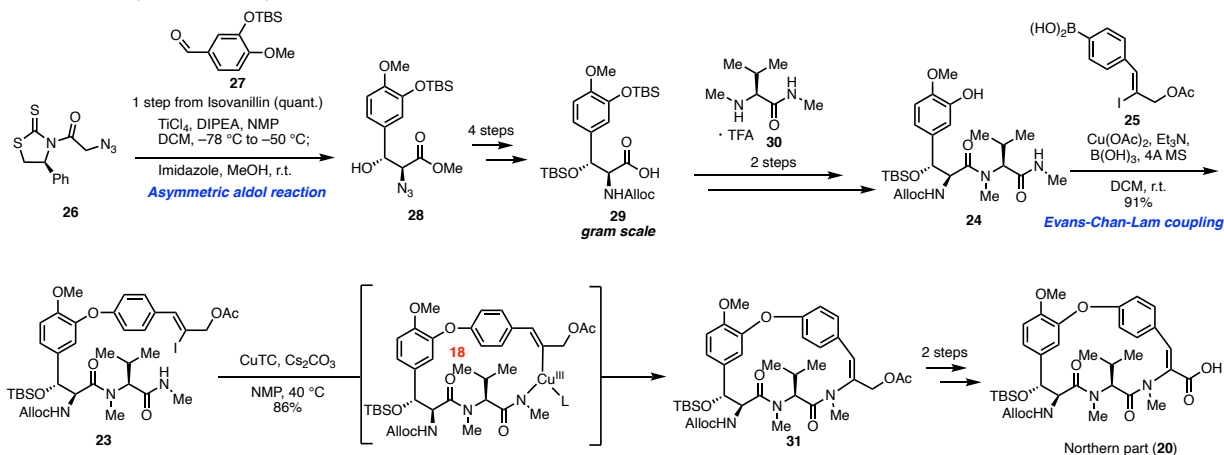
## 【Northern part (20)の合成】

**20** の合成に関して、一般にイソジチロシン型トリペプチド構造は、鎖状構造が安定であり、歪んだ環構築が困難である<sup>11)</sup>。そこで演者は、**20** のエナミド構造に着目し、Cu を介し環拡大した遷移状態をとることが出来る Buchwald-Hartwig カップリングにて環化反応を行うこととした。一方でビアリールエーテル構造の構築に関しては **24** に対し、穏和かつ化学選択的にカップリングが進行する Evans-Chan-Lam カップリングを適用することとした (Scheme 3)。



Scheme 3 Northern part (**20**)の逆合成

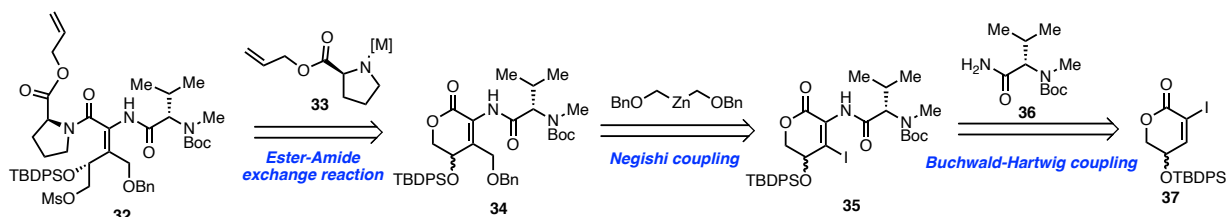
はじめに **26** を用いた立体選択的な aldol 反応によって得た **28** を種々官能基変換に付すことで **29** を合成した。その後、**24** へと変換し、別途調製した **25** との Evans-Chan-Lam カップリングによって 91%と良好な収率にてビアリールエーテル構造を構築した。続いて鍵となる Buchwald-Hartwig カップリングによる環化反応においては、CuTC を作用させることで 86%と高収率にて **31** を与える条件を見出し、アリルアルコールを酸化することによって **20** の合成を達成した (Scheme 4)。



Scheme 4 Northern part (**20**)の合成

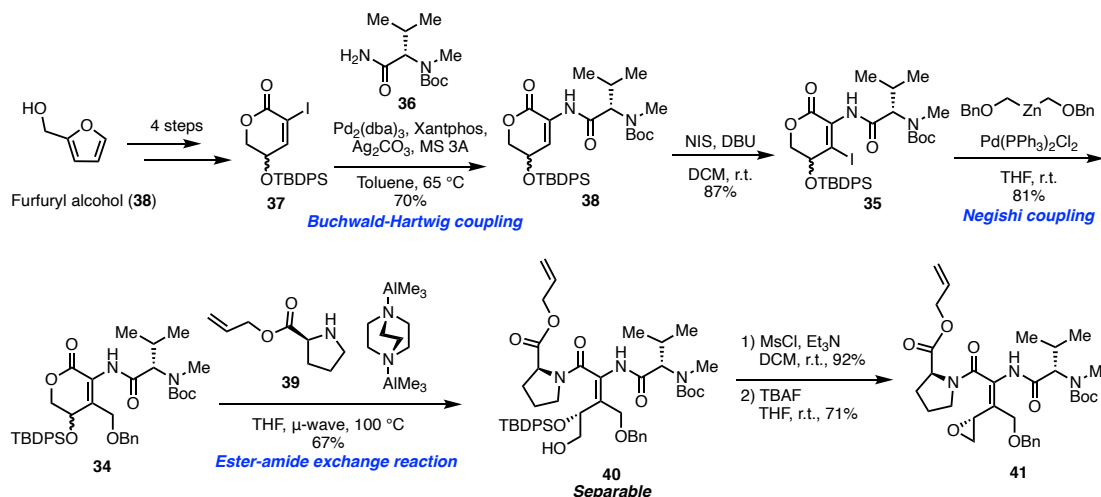
## 【デヒドロイソロイシン酸化型異常アミノ酸 **41** の合成】

一方で、デヒドロイソロイシン酸化型異常アミノ酸部位の合成に関しては、**34** に対してプロリン金属種を作用させるエステル-アミド交換反応によって合成可能なものとし、エナミドを含む 4 置換オレフィンの構築に関しては根岸カップリングと Buchwald-Hartwig カップリングによって、**37** を順次官能基化することでできるものと考えた (Scheme 5)。



Scheme 5 デヒドロイソロイシン酸化型異常アミノ酸 **32**の逆合成

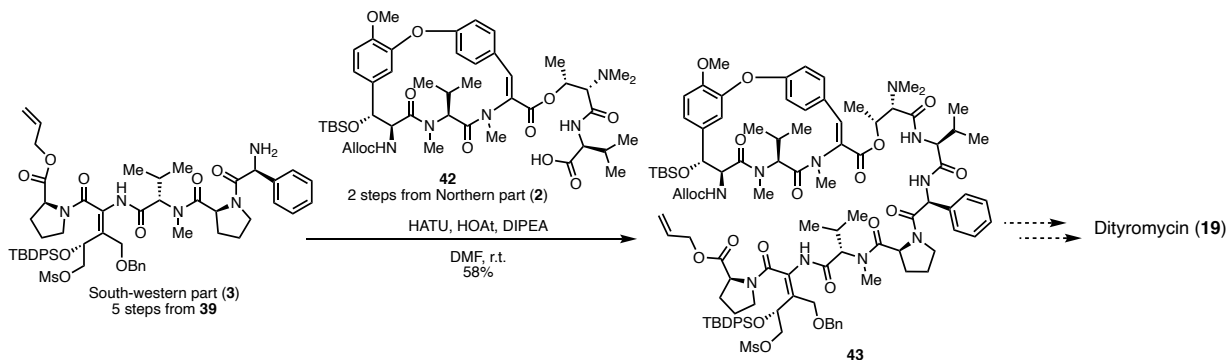
**38** より数工程の変換にて導いた **37** に対し **36** との Buchwald-Hartwig カップリングを試みた。種々反応条件を検討したところ目的の **38** を 70%の収率にて取得し、その後数工程の変換によって **34** を得た。そして **39** とのエステル-アミド交換においては、DABAL-Me<sub>3</sub>を用いたマイクロ波照射条件にて 67%の収率にて **40** を得ることができ更に、脱離基の導入と TBAF による処理によって **41** の合成を完了した (Scheme 6)。



Scheme 6 異常アミノ酸 **41**の合成

## 【結論】

演者は新規 PPI 阻害剤創製に向け Dityromycin (**19**)を標的とした全合成研究を展開し、異常アミノ酸ユニットである **20** と **41** の合成法を確立した。そして全合成に向け、種々ペプチドの縮合と官能基変換によって両ユニットを併せた **43** を用いて環化反応の検討を行っている (Scheme 7)。



Scheme 7 デカペプチド **43**の合成

【参考文献】

- 1) S. Ōmura *et al.* *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1356. 2) Y. K. Qiu *et al.* *J. Agric. Food. Chem.* **2019**, *67*, 2877. 3) H. M. Mizioro *et al.* *Biochemistry* **2012**, *51*, 4713. 4) H. Hoveyda *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7137. 5) S. Ley *et al.* *Tetrahedron* 1989, *45*, 7161. 6) K. Sekimizu *et al.* *Sci. Rep.* **2016**, 22894. 7) S. Ōmura *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1636*, 22. 8) M. Kanaida *et al.* *ChemMedChem*, **2021**, *16*, 2106. 9) S. Ōmura *et al.* *Agric. Biol. Chem.*, **1977**, *41*, 1827. 10) T. A. Steiz *et al.* *Cell Reports*, **2014**, *6*, 357. 11) S. Yamamura *et al.* *Tetrahedron Letters*, **1988**, 559.