

Kozeptins, Antimalarial Lipopeptides Produced by a Fungus
Paracamarosporium Species:
Isolation, Structural Elucidation, Total Synthesis, Bioactivity, Development of a
New Synthetic Method, and Structure-Activity Relationship

感染制御科学専攻・生物有機化学研究室

DI-18003 林 裕美

【研究背景】

マラリアは世界三大感染症の一つであり、2019年の年間罹患者数は200億人以上、死者数は40万人以上と、サハラ以南に位置するアフリカの熱帯・亜熱帯地域を中心に依然広く猛威を振るっている。さらに近年、既存の抗マラリア薬に対する耐性原虫の出現が深刻化しており、新たな骨格と作用機序を有する新薬の開発が強く望まれている。大村智記念研究所における抗マラリア活性物質探索スクリーニングの結果、新種と推定される糸状菌 *Paracamarosporium* 属 FKI-7019 株が選抜された。著者らは、本株の培養液から抗マラリア活性物質を単離し、その構造決定、全合成、生物活性評価、さらには誘導体合成のための新たな合成法開発と各種誘導体合成、構造活性相関研究を行ったので報告する。

【新規抗マラリア活性リポペプチド kozeptin A および B の単離、構造決定】²⁾

Paracamarosporium 属 FKI-7019 株培養液から抗マラリア活性物質の単離を試みたところ、2種の新規化合物の単離に成功し、それぞれ kozeptin A (**1a**) および B (**1b**) と命名した (Figure 1)。特に **1a** は熱帯熱マラリア原虫のクロロキン耐性 K1 株および感受性 FCR3 株の両方に対しサブ μ M オーダーで抗マラリア活性を示した。またヒト正常線維芽細胞 MRC-5 に対する細胞毒性は **1a**、**b** とともに低いことが明らかとなった。



Paracamarosporium
FKI-7019

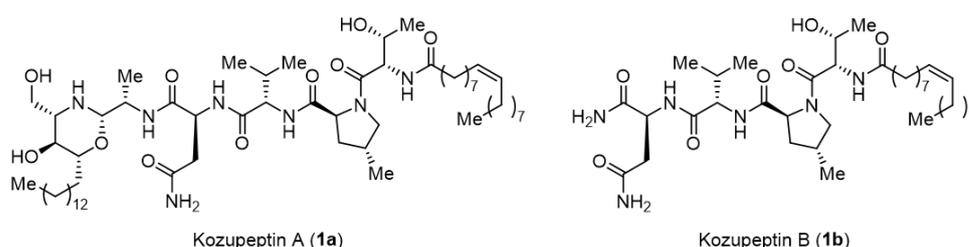


Figure 1. kozeptin A (**1a**) および B (**1b**) の構造とその生産菌

誘導化を含む各種スペクトルの測定により **1a** および **1b** の構造決定を試みたところ、ともにリポペプチド化合物であることが判明した。特に活性の高い **1a** は、*N,O*-アセタール型に結合したファイトスフィンゴシン部分、ペプチド部分、脂肪酸部分を併せ持つ珍しい構造の化合物であった。立体構造に関して、**1a** のファイトスフィンゴシン部

分は相対立体構造の決定のみにとどまった。微生物培養液から単離できる **1a**、**b** の量は極めて少なく、培養の再現性も確保できなかったため、誘導化や *in vivo* 試験等、抗マラリア薬候補化合物開発に向けた様々な検討の実施が困難であった。そこで、完全な絶対立体構造の決定および化学合成による量の供給を目的とし、**1a** の全合成研究に着手した。

【疎水性アンカー分子を用いた **kozupeptin A** の全合成と絶対立体構造の決定、抗マラリア活性評価】²⁾

長いアルキル鎖を有する疎水性アンカー分子を用いたペプチド合成法は、2000年に初めて提唱された手法である³⁾。古典的な液相ペプチド合成法と、様々な応用が進んでいる固相ペプチド合成法の両方の長所を併せ持つが、その報告例は多くない。

今回、実用的な全合成経路の確立を目指し、上記の疎水性アンカー分子を用いたペプチド合成法により **1a** の合成を開始した (**Scheme 1**)。検討の結果、フルオレン型アンカー分子^{3⁴⁾}を用いることでペプチド鎖の伸長およびオレイン酸の縮合を効率的に行うことができ、化合物 **10** を得た。各工程は高収率で進行し、精製は全て晶析のみで高純度の中間体を得た。酸性条件にて Thr の *t*-Bu 基とアンカー分子を同時に除去した後、C 末端アルデヒドを得るために Weinreb アミド体 **12** への変換を試みたが、Ala の α 位エピメリ化が問題となった。そこで種々の縮合剤の検討を行ったところ、DEPBT⁴⁾を用いることでエピメリ化を大きく抑制できた (得られた **12** の *dr*=97/3)。次に LAH を用いて **12** をアルデヒド体 **13** へと還元し、続く天然型ファイトスフィンゴシン **14** との *N,O*-アセタール形成により、目的の **1a** を得た。合成した **1a** の分光学的データは全て天然より単離されたものと一致したため、ファイトスフィンゴシン部分の絶対立体構造は天然型 (2*S*, 3*S*, 4*R*) であると決定された。

活性評価の結果、合成品の **1** は確かに *in vitro* において天然由来のものと同等の抗マラリア活性を示した (**Table 1**)。また、中間体のアルデヒド体 **13** が極めて強い抗マラリア活性 ($IC_{50} = 8.3$ nM) を示すことが明らかになった。さらに、合成した **1a** および **13** は *in vivo* (i.p.)においても抗マラリア活性を示し、特に **13** は既存薬 artesunate に匹敵する強い活性を示した。

Scheme 1. フルオレン型アンカー分子を用いた kozupeptin A (1a)の実用的全合成

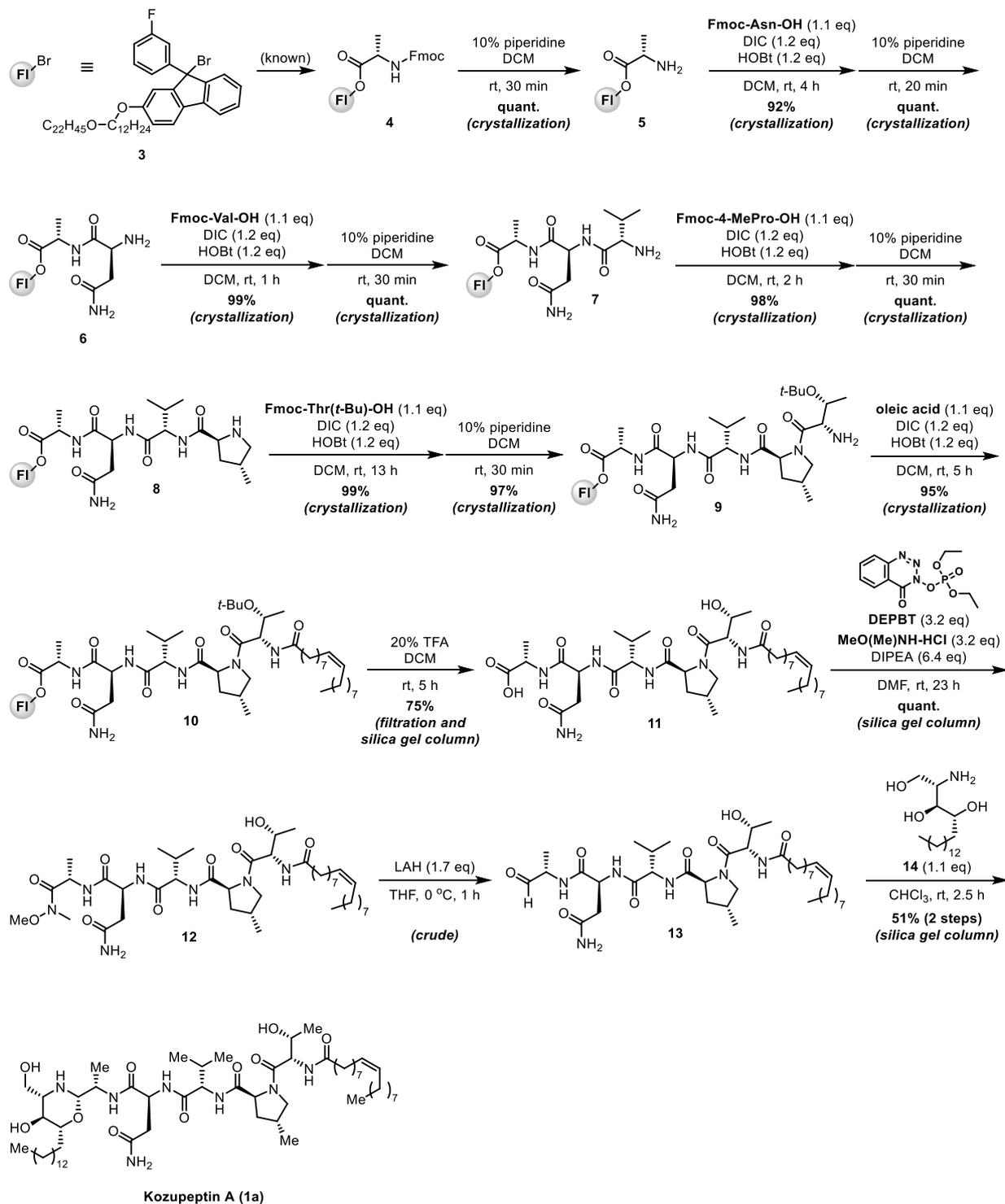


Table 1. 抗マラリア活性評価の結果 (*in vitro*)

compound	IC ₅₀ (μM)		
	antimalarial activity		cytotoxicity
	K1 strain ^[a]	FCR3 strain ^[b]	MRC-5
1a (natural)	0.15	0.29	>23
1b (natural)	1.03	1.46	>35
1a (synthetic)	0.30	0.55	>23
13 (aldehyde) ^[c]	0.0083	0.013	>32
12 (Weinreb amide)	12.5	>15.2	>30
11 (carboxylic acid)	>16.0	N/A	>32
chloroquine ^[d]	0.17	0.038	58 ^[e]
artemisinin ^[d]	0.019	0.023	160 ^[e]

[a] Chloroquine-resistant strain. [b] Chloroquine-sensitive strain. [c] Purified by silica gel column chromatography for the evaluation. [d] Drugs commonly used to treat malaria. [e] *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 183.

【新規疎水性アンカー分子を用いた **kozupeptin A** 前駆体ペプチドアルデヒドの効率的合成法の開発】⁶⁾

前述の通り、**kozupeptin A (1a)**の全合成前駆体であるペプチドアルデヒド体 **13** が高い抗マラリア活性を有することを見出した。一方で上記の全合成は、疎水性アンカー分子を用いた比較的実用的な合成法ではあるものの、1) C 末端アルデヒドのエピメリ化、2) 反応・精製に優れた性質を持つアンカー分子の除去後に高活性アルデヒドへと導くのに数ステップを要する、といった課題も残している。そこで我々は、ペプチドアルデヒド類のより効率的な合成法の確立を目指すこととした。

一般に、ペプチド C 末端カルボン酸の活性化による縮合反応はエピメリ化のリスクが高いことが知られているため⁷⁾、合成にあたり経路しないのが望ましい。一方で、C 末端ペプチドアルデヒドの合成法として最も一般的に用いられているのは、上記の全合成で用いた Weinreb アミド体の利用である。C 末端をペプチド伸長前から Weinreb アミド型にしておけば、エピメリ化のリスクは回避できかつアルデヒドへと直截的に変換できると考えられるが、これまで開発されてきた固相合成における当該手法は、反応性・収率に課題があるものが多い。そこで我々は、これらの課題を解決するため、疎水性アンカー分子によるペプチドアルデヒド類の効率的な合成法の開発を行った。

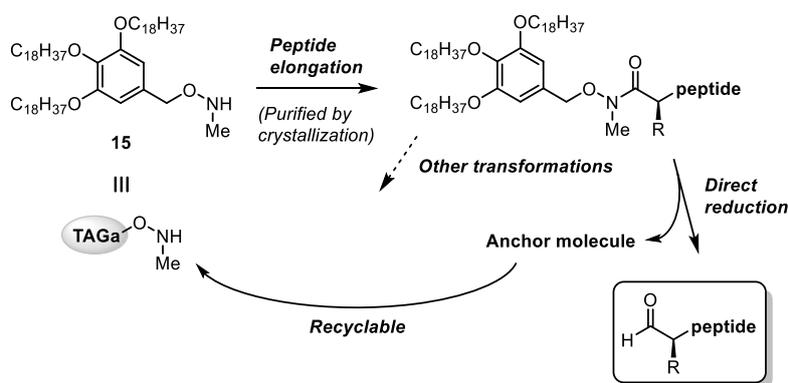
具体的には、ペプチド C 末端と Weinreb アミド型で結合を形成する新規疎水性アンカー分子を設計することで (**Scheme 2**)、ペプチド C 末端をエピメリ化の懸念無く直截的にアルデヒドへと変換できると考えた。設計したアンカー分子 **15** は、安価な市販原料から数十 g スケールで容易に合成することができた。

実際に **kozupeptin A** 前駆体アルデヒドの合成に本アンカー分子を適用したところ、ペプチド伸長反応は非極性溶媒中で効率的に進行し、反応終了後に極性溶媒を直接加えて晶析するという簡便な精製操作で、高純度のペプチドアルデヒド前駆体をほぼ定

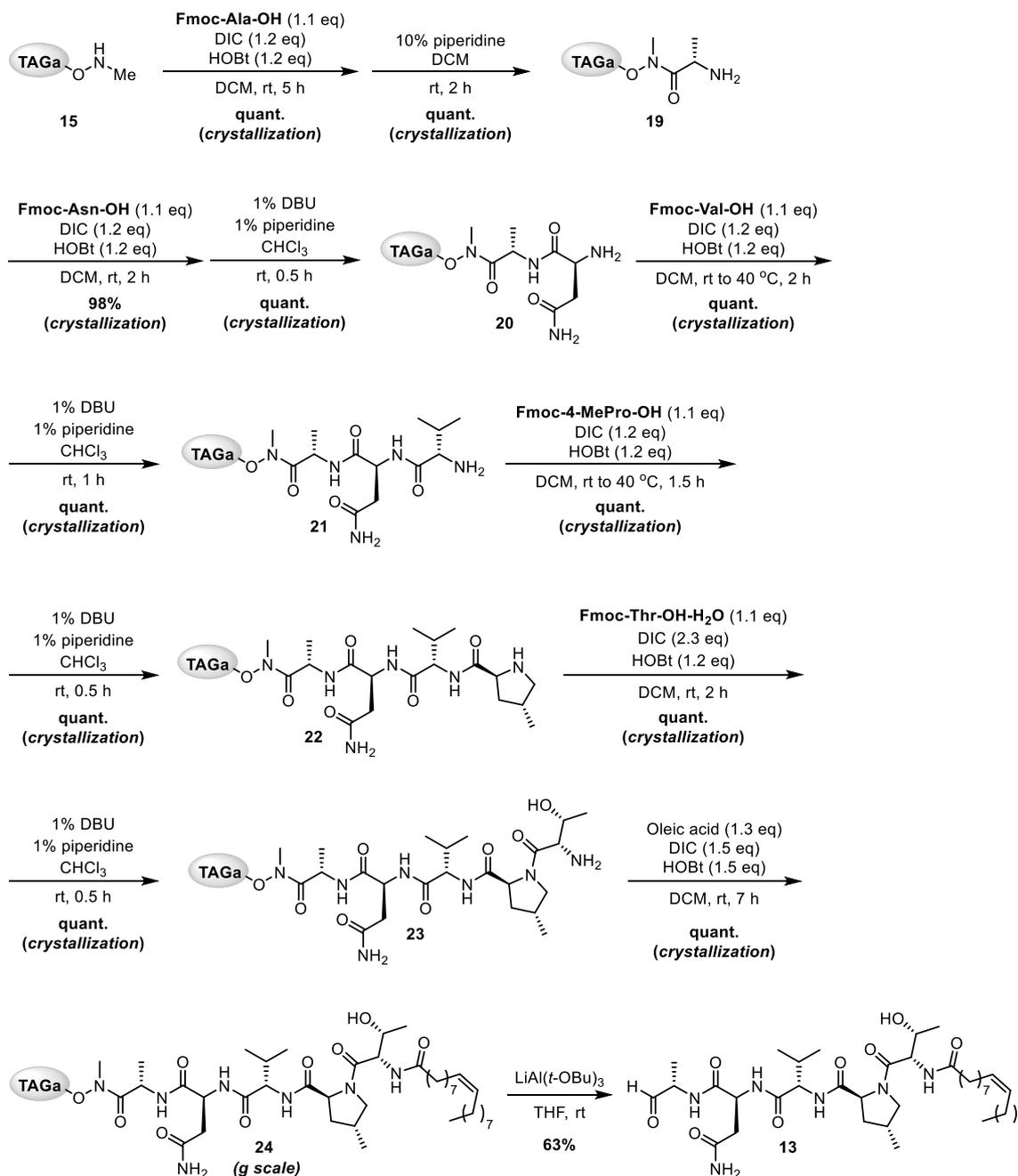
量的に得ることができた (**Scheme 3**)。得られた前駆体は、 $\text{LiAl}(\text{O}t\text{-Bu})_3$ と反応させることで、期待通り全くエピメリ化することなく直截的にペプチドアルデヒドへと変換することができた。加えて、今回設計した疎水性アンカー分子は、還元反応後に簡便な操作で定量的に回収が可能であり、本ペプチド合成法のデメリットである原子効率の悪さも同時に解消することができた。

また、本合成法は **kozupeptin** 以外のペプチドアルデヒド化合物合成にも幅広く用いることができると考えられ、種々のプロテアーゼ阻害活性を示し医薬品シーズとして期待されるペプチドアルデヒド類合成への応用も期待できる。

Scheme 2. 新規疎水性アンカー分子の設計



Scheme 3. 新規疎水性アンカー分子を用いた **kozupeptin A** 前駆体ペプチドアルデヒドの直截的合成



【誘導體合成と構造活性相関研究】

上記で開発した合成手法を利用して各種誘導體を合成し、抗マラリア活性およびヒト正常線維芽細胞 MRC-5 に対する細胞毒性評価を行った。

現在までの評価により明らかとなった相関を以下にまとめた (**Figure 2**)。C 末端の官能基に関しては、アルデヒドが特異的に強力な抗マラリア活性を示し、**kozupeptin A (1a)** が有する *N,O*-アセタール構造はその等価体と考えられる。N 末端に結合した脂肪酸については、現在までにオレイン酸が最も強い抗マラリア活性を示しており、アル

キル鎖が短くなると活性が低下する傾向が見られた。ペプチド部分を構成するアミノ酸に関しては、ThrのOH基、および非天然型アミノ酸である4Me-ProのMe基が活性に重要であることが判明した。一方で、C末端Alaの立体構造やAsnのアミド基は変更可能であることも分かった。また、ペプチド部分を大幅に変更した誘導体が全く活性を示さなかったことから、全体のペプチド配列が重要であることが分かった。なお、合成した各種誘導体は総じて、MRC-5に対する細胞毒性が低かった。

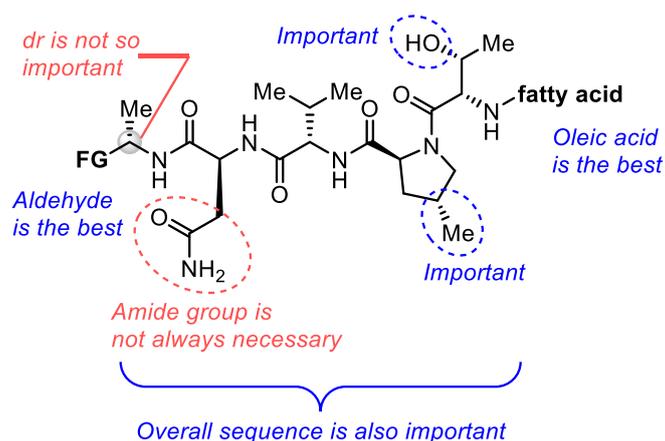


Figure 2. 構造活性相関のまとめ

【結論】

抗マラリア活性物質探索スクリーニングにより見出された新規抗マラリアリポペプチド kozupeptin 類に関する合成および創薬研究を展開した。Kozupeptin 類はその珍しい骨格から新しい作用機序を有する抗マラリア薬候補化合物となる可能性があり、今回得られた知見や開発した合成手法を用いることで、今後さらなる効果的な創薬研究を推進できると期待される。

【参考文献】

- 1) World Health Organization, *World Malaria Report 2020*.
- 2) **Hayashi, Y.**; Fukasawa, W.; Hirose, T.; Iwatsuki, M.; Hokari, R.; Ishiyama, A.; Kanaida, M.; Nonaka, K.; Také, A.; Otaguro, K.; Ōmura, S.; Shiomi, K.; Sunazuka T. Kozupeptins, Antimalarial Agents Produced by *Paracamarosporium* Species: Isolation, Structural Elucidation, Total Synthesis, and Bioactivity. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 2180.
- 3) Tamiaki, H.; Obata, T.; Azefu, Y.; Toma, K. A Novel Protecting Group for Constructing Combinatorial Peptide Libraries. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 733.
- 4) Takahashi, D.; Yamamoto, T. Development of an efficient liquid-phase peptide synthesis protocol using a novel fluorene-derived anchor support compound with Fmoc chemistry; AJIPHASE®. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1936.
- 5) Li, H.; Jiang, X.; Ye, Y.-h.; Fan, C.; Romoff, T.; Goodman, M. 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-

- 1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-one (DEPBT): A New Coupling Reagent with Remarkable Resistance to Racemization. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 91.
- 6) **Havashi, Y.**; Hirose, T.; Iwatsuki, M.; Ōmura S.; Sunazuka. T. Synthesis of the Antimalarial Peptide Aldehyde, a Precursor of Kozupeptin A, Utilizing a Designed Hydrophobic Anchor Molecule. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 8229.
- 7) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827.