

<資料>

カナマイシン誘導体合成研究の思い出ーカナマイシン発見 60 年に寄せてー

池田大四郎

元財団法人微生物化学研究会

(2017 年 12 月 1 日受付)

はじめに

「アミノグリコシド抗生物質カナマイシン発見 60 周年を記念して The Japanese Journal of Antibiotics で特集を企画しているので、カナマイシン誘導体合成研究におけるエピソードを寄稿して欲しい」という依頼をうけました。筆者は 2010 年に退職して以来サイエンスの道からすっかり足を洗っており、「今更皆さんに何かをお伝えするようなことは何もないから」と固辞しましたが、「筆者の思い出話を通して当時の研究室などの様子をお伝えすることができれば、何かしらお役に立つことがあるかもしれない」という思いに至り、最終的に寄稿することを引き受けることにした次第です。

1. カナマイシンとの出会い

筆者とカナマイシン (Kanamycin; KM) の出会いは、1967 年慶應義塾大学工学部応用化学科で卒業論文研究のため、梅澤純夫教授の研究室を希望したことに始まります。爾来 KM をはじめリボスタマイシン (Ribostamycin)、ブチロシン (Butirosin)、イスタマイシン (Istamycin) などアミノグリコシド抗生物質とは年代により濃淡はあるものの 40 年以上ずっと付き合ひとなりました。当時梅澤純夫先生は 57、8 歳で工学部長という激務の中で研究指導をされていました。そのようなお忙しい中でも毎年の卒業論文と修士論文発表会終了後の謝恩会には必ず参加され、お酒が入って学生達が余興を披露する流れの中で、先生が都々逸を披露されたことが幾度かありました。当時の教授はなかなか粋な芸をお持ちだったことに感心致しました。また梅澤純夫先生は工学部設立 30 周年の記念講演において、1939 年当時の慶應義塾塾長小泉信三博士が当工学部の前身となる藤原工業大学の新入学生に訓辞した『自我作古(われよりいこしえをなす)』という言葉引用されつつ、**学問の世界でひたすら研鑽を積み、新しいことに敢然と挑戦することの大切さ**を話されました。聴衆の一人であった大学院生の筆者が大変感銘を受けたことを鮮明に覚えています。大東亜戦争末期 1945 年 4 月の空襲による校舎の焼失、その後 8 月の米軍による日吉接收により工学部のキャンパスが転々とする(目黒、溝ノ口など)歴史を経て、1949 年に移転した小金井市前原町の横河電機製作所工場跡地を改修した小金井キャンパスの飛び地(府中市浅間町)にあった管理工学科の大教室での講演でした。

2. 耐性菌にも有効なカナマイシン誘導体をつくる

さて、研究の方に話を移すと、当時梅澤純夫研究室にはスタッフと学生あわせて 40 名近くが在籍しており、いろいろなテーマの研究が進行していました。その中でアミノグリコシド抗生物質に関しては、厚東伸佑博士、竜田邦明博士らによる KM の全合成研究¹⁾が完成間近であり、その誘導体の合成研究も行われていました。さらに 1968 年米国留学から帰朝された土屋務博士が梅澤研究室に戻られ、KM 誘導体

の合成研究に加えてデオキシ糖類の合成研究も盛んに行われていました。一方、梅澤濱夫先生の微生物化学研究所では、耐性菌が産生する不活性化酵素により修飾された KM の構造が決定され^{2, 3, 4)}、さらにそれらのうち主たる不活性化化合物は KM の 3'-*O*-リン酸化体であることがわかりました。この研究結果から『KM がリン酸化されなければ KM は不活性化されない』というその後の耐性菌に対するアミノグリコシド誘導体合成における重要な作業仮説が導き出されました。耐性菌の出現により抗生物質としての役割を無くした化合物を復活させるために、耐性菌に有効な KM 類の合成研究がスタートしました。すなわち耐性菌対策としての目標は『リン酸化されない KM の合成』です。

誘導体合成について梅澤濱夫先生は、培養によって豊富に得られる原料(この場合は KM)を使うべきであるというお考えであり、一方梅澤純夫先生は有機合成化学の立場から、出発原料にとらわれずまず確実な方法で目的の化合物を合成することを一番にお考えであったと思います。そこで土屋博士らは武藤隆二郎博士、西村吉男博士(二人とも当時は大学院の学生)を中心とした KM 全合成の手法を応用したルートと、実用的な目的を持った方法として岡崎靖氏によるカナマイシン B (Kanamycin B; KMB)を出発原料としたルートを同時進行させることを計画しました。その結果それぞれのルートから目的化合物、3'-*O*-メチルカナマイシン⁵⁾、3'-デオキシカナマイシン⁶⁾および 3',4'-ジデオキシカナマイシン B⁷⁾(一般名ジベカシン Dibekacin; DKB)の合成に成功しました。武藤、西村ルートから合成された 3'-*O*-メチルカナマイシンが抗菌力をほとんど失っていたことから、KM は 3'位の水酸基がリン酸化であろうとメチル化であろうと修飾されてしまうと抗菌力を発揮出来ないことが判明しました。細菌が KM から自分自身を守るため、どうしてそのことを知ったのか耐性菌に聞いてみたいと思いませんか。一方、3'-デオキシカナマイシンは期待通り耐性菌をはじめ感受性菌にもすぐれた抗菌力を発揮しました。この結果は、後年開発されるマクロライド抗生物質 6-*O*-メチルエリスロマイシン(クラリスロマイシン Clarithromycin)の事例と比べると実に興味深いことです。

岡崎君は修士課程 2 年生で、4 月からの就職を控え卒業論文や修士論文発表後の研究室恒例のスキー旅行を断念し、1971 年 3 月 31 日まで研究室に来て研究を続け耐性菌に有効な DKB の合成を完成させました。夏はうだるような暑さの中、また冬は溶剤が普通に凍ってしまう当時の研究室で、皆がひたすら実験を繰り返す毎日を送っていた中から生まれた成果であり、生物学と有機合成化学の共同研究が実った瞬間でした。DKB はその後明治製菓に於ける合成プロセスの開発、臨床試験研究が行われ 1975 年パニマイシン® (Panimycin®)として臨床に供されることになりました。余談になりますが、本化合物はその構造由来の名前である 3',4'-Dideoxykanamycin B の頭文字をとって略称で DKB と呼ばれていました。その頃世間では第一銀行と日本勧業銀行が合併し、第一勧業銀行が出現しました。その一般略称も DKB でした。

後年三宅俊昭博士らは、3',4'-ジデオキシカナマイシンを合成しその抗菌力が DKB と比べ弱いことを確認しました。この事実は、もしこの研究のスタート時点で KM を原料に選んでいたら、DKB もましてや後に開発されるアルベカシン (Arbekacin; ABK)もこの世に出ることはなかったかもしれないということを示しています。なぜ KMB を出発原料に選んだのかについて本当の所はわからないのですが、土屋博士は米国オハイオ州立大の DH Horton 研究室に留学中 Tipson-Cohen 法によるデオキシ糖の合成研究を行っており、KM を出発原料に用いると 2', 3', 4'位に連続した 3 個の水酸基が存在してデオキシ化反応がより複雑になることを予測し、KMB を選んだのではないかと推測されます。以上ここまでは、DKB がうまれた同時期に梅澤純夫研究室に在籍し、日々その経緯を眺めていた筆者の思い出話であります。当時筆者

は別のテーマでやはりデオキシ糖類の合成研究に取り組んでいました。

時は流れ筆者がハーバード大学に留学中の 1976 年、梅澤濱夫先生と岡見吉郎博士がマサチューセッツ工科大学を訪問されました。関谷剛男博士が HG Khorana 教授の研究室に留学されており、JC Sheehan 教授のアレンジで梅澤濱夫先生が講演をされました。関谷博士からお声をかけていただき筆者も陪席させていただきました。梅澤濱夫先生はご自身の持論通り、講演ではデータを間違いなく聴衆に伝えるためにきちっと原稿を読まれていました。しかしそのあとの質疑応答では、質問者に対して大変流暢な英語でお答えになっておられたことが印象的でした。その日の夕食をボストンダウンタウンの Benihana of Tokyo で御馳走になり、帰国後の筆者の身の振り方をお世話いただきました。1977 年筆者は留学から帰国し、微生物化学研究所での新たな研究生生活をはじめることになりました。主任研究員近藤信一博士がトップの化学部二研(後の薬化学部)で KM 誘導体の合成をはじめとして微生物生産物の構造決定および合成研究です。化学部二研では、近藤博士、飯沼勝春博士らにより ABK⁸⁾がすでに合成されていました。ここでの KM 誘導体合成研究のその後の成果は近藤博士が詳細に述べておられる⁹⁾ので割愛します。ただ一つだけ梅澤濱夫先生からいただいた厳しいお言葉を紹介しておきます。「誘導体をつくる時、合成屋さんはどうして効かないものを先につくるのかね？」

3. ポストアルベカシン化合物を探す

時はさらに移り、1999 年ポスト ABK としての新しいアミノグリコシドの探索研究が再び始まりました。微生物化学研究所と明治製菓の間で新たな共同研究契約を結び、臼井孝之博士と箕輪宣人博士が中心となりコードネーム TS ではじまる誘導体の合成を開始しました。ポスト ABK として求められる化合物のプロファイルは、①MRSA と緑膿菌に対する抗菌力が ABK と同等以上であること、②ABK 中等度耐性菌の産生する二機能修飾酵素 AAC(6')/APH(2'')の基質にならないこと、③腎毒性が ABK より低いこと、という大変難しいものが設定されました。

本プロジェクトのスタートに当たり、過去に合成されたほぼすべてのアミノグリコシド誘導体を慎重に見直し、アミノグリコシド抗生物質の構造-活性相関をもう一度丹念に検討しました。そこから得られたのは想像していた通り、先述の要求された3つのプロファイルを満たす新しい構造を導き出せないということでした。ゴールが見えない試行錯誤による誘導体合成が始まりました。合成した化合物の評価では、腎毒性の評価が従来の方法ではサンプル量と時間の問題でスクリーニングとして適していないので、スクリーニングとして使える方法の開発も必要でありました。この点は、明治製菓の評価グループの皆さんにより克服することができました。打ち合わせの席上で「こんな方法が本当に腎毒性を反映しているのかねえ？」という厳しい指摘を受けながらも、実戦部隊は「取り敢えず一つの指標として使える」という確信をもってスクリーニングに応用しました。

2年ほどの間に数多くの誘導体を合成し、究極のアミノグリコシド TS2037¹⁰⁾ (Fig. 1)は史上最強の抗菌力を示しました。しかし、毒性については満足する結果が得られず、アミノグリコシドでは抗菌力と毒性の相関性を切り離せないという定説を追認したことになり、プロジェクトの最終局面に行き当たりました。

箕輪博士は本プロジェクトがスタートした早い時期に、2-ヒドロキシゲンタミシン C₁の低毒性に注目して ABK の2位に水酸基を導入することを提案していました。しかし、報告されているデータによると抗菌力はゲンタミシン (Gentamicin; GM) C₁に比べてきわめて弱く、ABK への応用は見送られてきました。

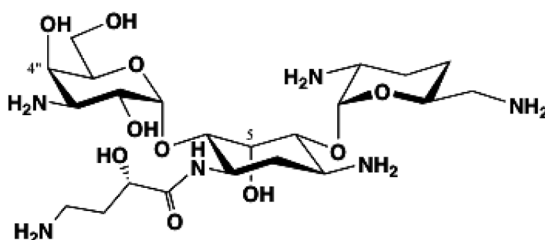


Fig. 1. Structure of TS2037

2003年11月28日(金)新横浜駅前の居酒屋に臼井孝之、箕輪宣人、村上 健、古林良彦各博士および筆者の5名が集まり、酒を飲みながらこのプロジェクトの行く末を論じ合いました。TS2037の結果を踏まえ、「これ以上の抗菌力を持った化合物を作り出すのは無理であろう。抗菌力に重点を置いた化合物を追求してきたけれども、方向を変えて毒性が低下する化合物を合成したらどうか。それには2位に水酸基を有するABKがいいのではないか。」という方向に話し合いが収斂して行きました。原料のこと、合成ルートのこと、人手のこと等々大いに意見交換がなされました。アミノグリコシドの合成をされた方にはこの化合物の合成がいかにか大変であるかご理解いただけることと思います。

「古林君! どうしようかねえ」

(独特のスタイルでタバコをふかしながら)

「う〜ん、やりましょう。泥臭いけれど一番確実な方法でとにかくつくっちゃいましょうよ」

という古林博士の力強い言葉を得て、当夜の会合はお開きとなりました。

その後ほぼ一年がかりで古林博士は三宅博士のもとで2-ヒドロキシアルベカシン(コード番号TS2705; Fig. 2)を合成しました¹¹⁾。合成途中で得られる2-ヒドロキシジベカシンの抗菌力がDKBに比して極めて弱いことがわかり少々ショックを受けましたが、この結果はGMとその2-ヒドロキシ体との関係と同じで想定範囲内でした。いずれにしろ最終目的物を合成しなければ結論は出せないわけで、古林博士は勇気を出して1位のアミノ基に(5S)-4-アミノ-2-ヒドロキシ酪酸を導入して合成を完成させました。TS2705の評価結果は素晴らしいもので、求められたプロファイル①〜③をほぼクリアすることができました。アミノグリコシド抗生物質誘導体の中ではじめて抗菌力と毒性(急性毒性および腎毒性)の関係を分離することができたことは実に夢のような成果でありました。その後、種々の詳しい評価を経てTS2705は高橋良昭博士らによる効率的な合成ルートの研究もなされるなど、開発に向けた注目の化合物となりました。筆者が本プロジェクトに携わったのはこの辺りまでで、その後のポストABK化合物探索研究についてのお話は機会があれば別の方にお任せすることにします。とにかく、本プロジェクトに関係されたすべての研究者の凄まじい執念と粘り腰の賜物がTS2705であったと思います。

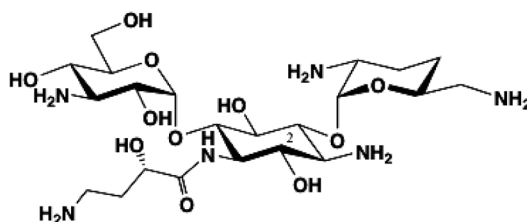


Fig. 2. Structure of TS2705

おわりに

本稿は、1970 年頃の KM の復活劇と 2000 年代のポスト ABK プロジェクトの展開について、筆者の脳内メモリーに格納されているデータと手許に僅かばかり残っている紙のデータを繋ぎ合わせたものであります。話の前後関係などいささか危ういところがあるかもしれませんが、脳内の配線ミスということでお許しいただきたいと思います。今後さらに優れたアミノグリコシド抗生物質が開発されることを期待しつつ本稿を閉じたいと思います。

謝辞

KM 発見 60 周年の記念すべき特集に寄稿する機会を与えていただいた堀田国元博士に深甚なる感謝の意を表します。忘れかけていた研究の厳しさと面白さを再び思い出すことができました。また、本稿投稿に関していろいろとお世話いただいた味戸慶一博士に厚く御礼申し上げます。

利益相反自己申告： 特に申告すべきものなし

参考文献

- 1) Umezawa S, Tatsuta K, Koto S: The total synthesis of kanamycin A. J Antibiot. 1968; 21: 367-8.
- 2) Okanishi M, Kondo S, Suzuki Y, Okamoto S, Umezawa H: Studies on inactivation of kanamycin and resistances of *E. coli*. J Antibiot. 1967; Ser. A 20: 132-5.
- 3) Umezawa H, Okanishi M, Kondo S, Hamana K, Utahara R, Maeda K, *et al.*: Phosphorylative inactivation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. Science 1967; 157: 1559-61.
- 4) Naganawa H, Kondo S, Maeda K, Umezawa H: Structure determinations of enzymatically phosphorylated products of aminoglycosidic antibiotics by proton magnetic resonance. J Antibiot. 1971; 24: 823-9.
- 5) Umezawa H, Tsuchiya T, Muto R, Umezawa S: Studies on amino sugars. XXIX. The synthesis of 3'-O-methylkanamycin. Bull Chem Soc Jpn. 1972; 45: 2842-7.
- 6) Umezawa S, Tsuchiya T, Muto R, Nishimura Y, Umezawa H: Synthesis of 3'-deoxykanamycin effective against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Antibiot. 1971; 24: 274-5.
- 7) Umezawa H, Umezawa S, Tsuchiya T, Okazaki Y: 3',4'-Dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Antibiot. 1971; 24: 485-7.
- 8) Kondo S, Iinuma K, Yamamoto H, Maeda K, Umezawa H: Synthesis of 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl]-kanamycin B and -3',4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria. J Antibiot. 1973; 26: 412-5.
- 9) 近藤信一: カナマイシンの発見とその耐性機構、そして耐性菌に有効な誘導体。Jpn J Antibiot. 2017; 70: 169-78.
- 10) Hiraiwa Y, Minowa N, Usui T, Akiyama Y, Maebashi K, Ikeda D: Effect of varying the 4"-position of arbekacin derivatives on antibacterial activity against MRSA and *Pseudomonas aeruginosa*.

Bioorg Med Chem Lett. 2007; 17: 6369-72.

- 11) 古林良彦、秋山佳央、村上健、箕輪宣人、津島正樹、平岩由起子、他：新規アミノグリコシド系抗生物質。特許：国際公開番号 WO2007/142150. 2007.