〈総 説〉

新しい抗生物質の開発を志向した天然物創薬ケミカルバイオロジー

掛谷秀昭

京都大学大学院薬学研究科 医薬創成情報科学専攻 システムケモセラピー (制御分子学) 分野

(2018年7月30日受付)

筆者は、2006年度(平成18年度)「微生物が生産する新規生理活性物質の開拓とケミカルバイオロジー研究」で「住木・梅澤記念賞」を受賞した。本年(2018年)で、12年の歳月が流れようとしている。

12といえば、干支、月、時間など多くのものの区切りの数でもある。この度、本総説に執筆機会を頂戴したのも大切な縁である。そこで本稿では、受賞後の研究の中から著者らが発見した新規抗生物質(抗細菌薬、抗真菌薬)を抜粋して紹介するとともに、本稿にも関連の深い新学術領域研究(研究領域提案型)「化学コミュニケーションのフロンティア(2017–2021)」について紹介する。

はじめに

近年,国内外において抗菌剤に対する耐性菌の出現と蔓延が問題となりつつあり,新規抗生物質の開発の遅れが極めて深刻な問題としてとらえられている^{1,2)}。2015年4月にWHO(世界保健機関)により発表された「Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014」においてもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE; vancomycin-resistant *Enterococcus*)をはじめとした各種耐性菌の増加に対する強い警告が記されており、世界的に新しい抗生物質の開発推進は喫緊の課題である³⁾。

このような背景の中, 当研究室では, 多因子疾 患(がん, 感染症, 心疾患, 神経変性疾患, 免疫 疾患など)を標的としたアカデミア発のオリジナル創薬に向けて、3つの研究グループ体制(天然物化学研究グループ、ケミカルバイオロジー研究グループ、メディシナルケミストリー研究グループ)で教育・研究を展開している⁴⁾。すなわち、"切れ味の鋭い生物活性物質(新薬)は新しいサイエンスを切り拓く"の理念のもと、主に下記の4つの研究課題を中心に先導的ケミカルバイオロジー研究を世界へ発信している。

- 1) 創薬リード化合物の開拓を指向した新規生物 活性物質の天然物化学 (天然物薬学) およびメ ディシナルケミストリー研究
- 2) 多因子疾患に対する次世代化学療法の開発を 指向した先導的ケミカルバイオロジー研究
- 3) 有用物質生産・創製のための遺伝子工学的研究
- 4) ケモインフォマティクス, バイオインフォマ

ティクスを活用したシステムケモセラピー研究 本稿では、受賞後の研究の中から著者らが発見 した新しい抗生物質(抗細菌薬、抗真菌薬)を中 心にした天然物創薬ケミカルバイオロジーについ て概説する。

放線菌 Streptomyces sp. KUSC_F05 が 生産する新規抗菌剤 tumescenamide C

放線菌 Streptomyces sp. KUSC_F05 は、複数の表現型スクリーニング結果から、多様な二次代謝産物の生産能を有していること、さらには特定の Streptomyces 属に対して増殖抑制を示すことが示唆された。そこで、Streptomyces 属に対する増殖

抑制活性を指標に活性物質を単離精製した結果, 新規化学構造を有する Tumescenamide C (1) を見 出した (図 1A) 5)。 Tumescenamide C は, 各種ス ペクトル (NMR, MS, UV など) の詳細な解析に よ り, D-Leu, D-Val, L-Thr, D-Tyr, 2-amino-2butenoic acid (Abu) および 2,4-dimethylheptanoic acid (Dmh) から構成されていることを明らかに した。通常アミノ酸の立体配置は改良 Marfey 法 により決定し,Abuに含まれる二重結合の立体化 学は NOEs より Z配置であると決定した。さらに, Dmh の立体配置については,1 の酸加水分解によ り得られた 2 の 2 位を PGME (phenylglycine methyl ester) 法により S配置と決定し,続いて 2 種類の ジアステレオマー (2a&2b) を不斉合成して,天

図1. Tumescenamide C (1) および関連化合物 (2, 2a & 2b) の化学構造

表1. Tumescenamide C (1) の抗菌活性

organisms	MIC	
	μg/disc (φ 6 mm)	
Streptomyces coelicolor A3 (2)	3	
Streptomyces lividans TK23	3	
Streptomyces sp. KUSC_F05	30	
Staphylococcus aureus IFO13276	> 100	
Bacillus subtilis IFO3134	> 100	
Escherichia coli IFO3972	> 100	
Pseudomonas aeruginosa IFO13275	> 100	

然由来の2と 1 H NMR スペクトルを比較することで4位の立体配置を決定した(図 1 B)。

Tumescenamide C (1) は, グラム陽性菌である Staphylococcus aureus や Bacillus subtilis, グラム 陰性菌である Escherichia coli や Pseudomonas aeruginosa の生育には全く影響を与えなかった。しかし, 大変興味深いことに, tumescenamide C (1) は, グラム陽性菌である Streptomyces 属の放線菌である Streptomyces lividans や Streptomyces

coelicolorに対しては顕著な生育阻害活性を示し、 Streptomyces 属の増殖シグナルを制御している可能性が示唆された(表1)。現在、tumescenamide C(1)の安定供給や構造活性相関研究のために全合成研究を行っている。

図2. Chlorocatechelins A (3) およびB (4) の化学構造

図3. Chlorocatechelin A (3) の全合成の概要

放線菌 Streptomyces sp. ML93-86F2 株が 生産する新規シデロフォア chlorocatechelin 類

微生物や植物はシデロフォアと呼ばれる低分子 化合物を分泌あるいは利用することで、自身の生 存戦略を企てている⁶⁾。このシデロフォアはFe (III) と非常に親和性が高く水溶性の錯体を形成することができ、形成したFe(III)-シデロフォア錯体を能動的に取り込み、錯体中のFe(III)を還元して取り出すことで微生物や植物は必要な鉄を獲得する。一方、Streptomyces pilosus など様々な微生物の産生するシデロフォアである desferrioxamine B (DFB) は、生化学分野などで鉄のキレート剤と

表2. Chlorocatechelins A (3) およびB (4) の抗菌活性

(A) Desferrioxamine B (DFB) 感受性細菌

organisms		MIC (μg/mL)		
	CCA^{c}	CCB^d	VCM ^e	
Staphylococcus aureus FDA 209P ^d	128	128	0.25	
Pasteurella piscicida 6395 ^e	32	64	> 64	
Mannheimia hemolytica N811 BBP 0101 ^d	32	64	> 64	
Escherichia coli K-12 ^d	32	64	32	

^achlorocatechelin A, ^bchlorocatechelin B, ^cvancomycin

(B) Desferrioxamine B (DFB) 非感受性細菌

organisms	MIC (μg/mL)		
	CCA^a	CCB^b	VCM ^c
Staphylococcus aureus MS9610	128	128	0.25
Micrococcus luteus IFO 3333	128	128	0.125
Bacillus subtilis NRRL B-558	128	> 128	0.0625
Enterococcus faecalis JCM 5803	> 64	> 64	0.25
Shigella dysenteriae JS11910	> 64	> 64	16
Proteus vulgaris OX19	64	64	2
Pseudomonus aeruginosa A3	64	> 64	16
Candida albicans 3147	64	64	128

^achlorocatechelin A, ^bchlorocatechelin B, ^cvancomycin

^dMICs of DFB against S. aureus, M. hemolytica, and E. coli were 128, 64, and 64 μg/ml, respectively.

^eDFB partially inhibited the growth of the *P. piscicida* strain at 64 μg/mL, whereas the MICs were >64 μg/ml.

して広く用いられているだけでなく、慢性鉄過剰 症の治療薬として用いられている⁷⁾。

そこで我々は、抗菌活性および Chrome Azurol S アッセイを指標に、微生物抽出液ライブラリーから 新規シデロフォアの探索研究を行った。その結果, 放線菌 Streptomyces 属 ML93-86F2 株が生産する, 天然物としては非常に稀なアシルグアニジン構造 を有するchlorocatechelins A (3) およびB (4) を 見出した (図2)⁸⁾。Chlorocatechelin A (3) は、分 子内に一つのarginine, 一つのN-δ-hydroxy-N-δformyl ornithine (hfOrn), および二つの4-chloro-2,3-dihydroxybenzoic acids (CDB) を有する。構成 アミノ酸の立体配置は改良Marfey法によりいずれ もD体と決定し、各種スペクトル (NMR, MS, UV など)の詳細な解析により全化学構造を決定した。 一方, chlorocatechelin B (4) は, CDB, ornitine, およびhfOrnを各一つ有し、構成アミノ酸はいずれ もD体であった。Chrolocatechelin類はこれまでに天 然物での報告例のないCDBを有していた。シデロ フォアは鉄の欠乏した環境で鉄を獲得するために 産生される化合物であるため、鉄の豊富な環境で は産生されない。そこで、鉄 (FeCl、あるいは FeSO₄) を加えた条件で Streptomyces 属 ML93-86F2 株を培養した結果, chlorocatechelin類は生産され ず、本化合物生産菌にとってもシデロフォアとして 機能していることが強く示唆された。一方, chlorocatechelin A (3) 11:1, chlorocatechelin B (4)

は3:1の比率でFe(III) と錯体を形成することが明らかになり、さらに、サイクリックボルタンメトリーを用いたFe(III)-シデロフォア錯体の還元電位の測定結果より、3のFe(III) との親和性は、4やDFBよりも大きいことも明らかになった 8,9 。なお、我々はすでにchlorocatechelin A (3) の安定供給のために、o-vanilin (7) と1-benzyl D-glutamate (9) からそれぞれ化合物8および10を合成し、両者の縮合、脱保護を行うことで3の全合成を達成している(図3) 9 。

次に、DFB感受性の細菌群に対する抗菌活性を 検討した結果, vancomycin は高い濃度でも魚類 感染菌である Pasteurella piscicida や牛肺炎原因 菌である Mannheimia haemolytica に対して増殖阻 害活性を示さなかった。一方, chlorocatechelins A (3) およびB(4) は両菌に対して増殖阻害活性を 示し、特に3は4よりも強い活性を有していた(表 2A) ⁹⁾。また、同じアッセイ条件でDFB 非感受性 菌であるStaphylococcus aureusに対する抗菌活性 を試験すると、vancomycinが非常に低い濃度で 阻害活性を示したのに対して, chlorocatechelins A (3) およびB (4) は高い濃度域においてのみ 阻害活性を示した(表2B)。Fe(III) 親和性の高い chlorocatechelin A (3) が chlorocatechelin B (4) よりも高い活性を示したことと、3と4がDFO感 受性の菌株に対してのみ増殖阻害活性を示したこ とから、これらの活性はDFBと同様に微生物が

図4. 全合成による mirubactin の構造訂正

mirubactinの提唱構造 (5)

dechloro-chlorocatechelin A (6)

図5. Saccharotriolides A (11)-F (16) の化学構造

利用可能な鉄を制限することによる効果であることが強く示唆された。

ところで、Marahielらは放線菌 Actinosynnema mirum が生産するシデロフォア mirubactin を報告 していた¹⁰⁾が、我々はmirubactinの各種スペクト ルの帰属およびシデロフォアとしての化学構造 (5) に疑問を感じた。そこで、mirubactinの真の 構造はdechloro-chlorocatechelin A (6) であると 推測し、chlorocatechelin A (3) の全合成経路に 倣って、6の全合成を達した。得られた6の¹H-NMR スペクトルおよび¹³C-NMRスペクトルは文献値 と良い一致を示した結果, mirubactinの真の構造 はdechloro-chlorocatechelin A (6) であると結論 付けた (図4)¹¹⁾。さらにmirubactinは、1:1の比 率でFe(III) と錯体を形成した。また、mirubactin のFe(III) との親和性は、chlorocatechelin A (3) よりも低いことを明らかにし、3の分子内のCI基 の重要性が示唆された。

希少放線菌 Saccharothrix sp. A1506株が 生産する新規抗真菌抗がん剤 saccharothriolide類

新規生物活性物質のケミカルスペース拡充戦略において、希少放線菌の利用は極めて有効である。我々は、ヒトがん細胞および分裂酵母を用いた表現型スクリーニングを行うことで、希少放線菌 Saccharothrix sp. A1506 株が生産する新規抗真菌抗がん剤saccharothriolides A (11)-F (16)を見出した (図5) 12,13 。

Saccharothrix 属放線菌は、rebeccamycin、saccharothrix 属放線菌は、rebeccamycin、saccharothridine A、tianchimycin A をはじめとして化学構造的にも生物活性的にも多様性に富んだ化合物群を産生しているが、saccharothriolides A(11)—E(15)は分子内のすべてのsp³炭素が不斉炭素である10員環ラクトンを基本骨格としているのが特徴的である。Saccharothliolide F(16)は、saccharothriolides A(11)およびD(14)のC-2位における脱メチル体であった。これらsaccharothriolide類の化学構造は、各種スペクトル(NMR、

MS, UV など)の詳細な解析やECD スペクトルのTD-DFT 法 な ど に よ り 決 定 し た。 さ ら に、saccharothriolides B (12) と E (15), A (11) と D (14) はそれぞれジアステレオマーの関係にあるなど,同一生産菌におけるこれら類縁化合物の生産の意義および生合成経路に興味がもたれた。さらに我々は、saccharothriolides A (11)—C (13)の生合成経路を図6に示した通り推定しており、ごく最近,中間体 presaccharothriolide X の 単離・同定に成功した 14 。

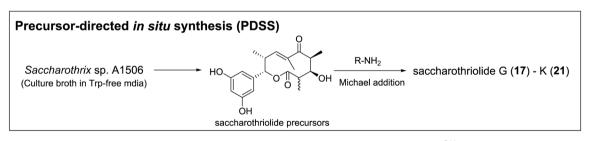
中間体 presaccharothriolide X (22) の存在を証

明できたことで、より効率的に、さまざまな求核 試薬と反応させ簡便に saccharothriolide 類の類縁 化合物を合成可能な precursor-directed *in situ* synthesis (PDSS) 法の開発に成功した¹⁵⁾。 PDSS 法の利点は、反応性に富んだ不安定中間体の単離 精製や生合成酵素の同定・精製が不要であること や任意の求核試薬を利用可能であることなどであ る。これまでに *Saccharothrix* sp. A1506の培養抽 出物に対して、求核試薬として o-anisidine, 3-methoxyaniline, 3-aminophenolを用いた PDSS 法により、saccharothriolides G (17)-K (21) の設

図 6. Saccharothriolides A (11)-C (13) の推定生合成機構

$$\begin{array}{c} & & & \downarrow \\ & \downarrow \\$$

図7. PDSS法による saccharothriolides G (17)-K (21) の設計・創製



saccharothnolide G (17): 2R-Me Saccharothnolide T (19): 2R-Me Saccharothnolide K (saccharothnolide H (18): 2S-Me Saccharothnolide J (20): 2S-Me

計・創製に成功している (図7)14,15)。

Saccharothriolides A (11)-K (21) および presaccharothriolide X (22) のヒト線維肉腫細胞 HT1080に対する細胞増殖抑制活性は、表3に示した通り、saccharothriolide B (12) および presaccharothriolide X (22) が同程度に強く、C-2位における置換基および立体化学、C-7位および C-2″位における置換基の効果など非常に興味深い構造活性相関を示した。さらに、我々は生理的条件下で、saccharothriolide B (12) より 2-aminophenol が遊離し presaccharothriolide X (22) を生じることを明らかにし、2-aminophenol が医薬品のプロドラッグ型保護基として利用できる可能性を示した(図8)。一方、saccharothriolides B (12)

表3. Saccharothriolides類のヒト線維肉腫 細胞HT1080に対する50%増殖抑制 濃度(IC₅₀値、μM)

	presaccharothriolide X (22)	12.3
natural products	saccharothriolide A (11)	> 100
	saccharothriolide B (12)	13.9
	saccharothriolide C (13)	> 100
	saccharothriolide D (14)	> 100
	saccharothriolide E (15)	29.2
	saccharothriolide F (16)	66.4
analogs	saccharothriolide G (17)	53.5
	saccharothriolide H (18)	24.8
	saccharothriolide I (19)	37.2
	saccharothriolide J (20)	70.2
	saccharothriolide K (21)	82.7

は、プロリンを窒素源とした最小生育培地 (EMM-N培地)において、分裂酵母の増殖を選択 的に抑制し、特定のアミノ酸代謝を制御するとい う非常にユニークな作用機序が示唆された(図 9)。現在、saccharothriolide類の安定供給や構造活 性相関研究のために全合成研究を行っている。

化学コミュニケーションのフロンティア

2017年度, 文部科学省·新学術領域研究 (研究 領域提案型)「化学コミュニケーションのフロン ティア (2017-2021) | (領域代表・掛谷秀昭(京 大院薬)) が発足した (図10)。本領域では、多種 多様な化学コミュニケーションの統合的理解にき わめて有効な「革新的高次機能解析プラット フォームの構築 | を行い、「天然物リガンドの真の 生物学的意義の解明」および「ケミカルツール分 子・創薬シーズ開発」を推進している。本領域は、 医療・農業・食糧分野などに貢献し、最終的には 自然環境における多様な生物種における化学コ ミュニケーションの解明と制御を主眼とした「分 子社会学 という新しい学問領域の確立を目指す ものであり、天然物創薬ケミカルバイオロジー研 究分野において、世界における日本のプレゼンス 向上にも大きく寄与するものである。したがっ て、本領域は新しい抗生物質の開発にも関連深い ものである16)。

図8. Saccharothriolide B(12)から presaccharothriolide X(22)の推定生成機構

図9. Sccharothriolide B (12) のプロリン (Pro) を窒素源とした最小生育培地 (EMM-N培地) における分裂酵母 (野生株) に対する選択的増殖抑制効果

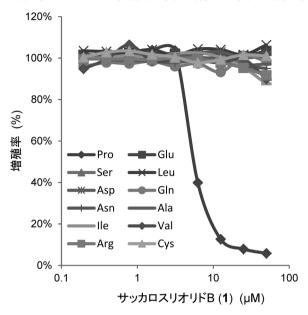


図10. 化学コミュニケーションのフロンティア



おわりに

本稿では、著者らの最近の天然物創薬ケミカルバイオロジー研究について、新規抗生物質のリード化合物としてのtsumescenamide C(1)、chlorocatechelin類およびsaccharothriolide類を抜粋して紹介した。また、抗生物質などを対象とした生物

活性物質のケミカルスペース拡充戦略において、 生合成中間体などを効率よく活用するPDSS法の 開発・応用について紹介した。また、日本発の天 然物創薬ケミカルバイオロジー研究をより一層推 進可能な新学術領域研究(研究領域提案型)「化学 コミュニケーションのフロンティア」について紹 介した。世界遺産(古都京都の文化財)に囲まれ た著者らの天然物創薬ケミカルバイオロジー研究 が、人類の健康・福祉に貢献する日を期して、一 層精進する所存である。

謝辞

本稿で紹介した研究成果に関しまして、岸本真治博士、五十嵐雅之博士、Shan Lu博士、西村慎一博士をはじめとして、多くの共同研究者の皆様に深謝します。本研究は、JSPS科学研究費、日本医療研究機構 AMED などの支援のもとに行われました。

利益相反自己申告

申告すべきものなし

[この総説は2006年度住木・梅澤記念賞受賞者 掛谷 秀昭博士が受賞後の研究の一部をまとめたものです。]

参考文献

- Arias CA, Murray BE: Antibiotic-resistant bugs in the 21st century—a clinical super-challenge. N Eng J Med. 2009; 360: 439–443.
- 2) Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O: Antibiotic resistance—the need for global solutions. Lancet Infect Dis. 2013; 13: 1057–98.
- 3) WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. [http://www.who.int/drugresistance/document/surveillancereport/en/(2014).]
- 4) a) Kakeya H: Natural products-prompted chemical biology: phenotypic screening and a new platform for target identification. Nat Prod Rep. 2016; 33: 648–54. b) 掛谷秀昭:特集「細胞を化学で観察する・操作する」―発展著しい日本のケミカルバイオロジーを俯瞰す

- る一。創薬ケミカルバイオロジー:シード分子開発と分子プロファイリング。生体の化学。2015; 66: 119–125. c) 掛谷秀昭: Discovery Science に魅せられて:天然物創薬ケミカルバイオロジーの最前線。化学と生物。2018; 56: 210–6.
- Kishimoto S, Tsunematsu Y, Nishimura S, Hayashi Y, Hattori A, Kakeya H: Tumescenamide C: An antimicrobial cyclic lipodepsipeptide from *Streptomyces* sp. Tetrahedron. 2012; 68: 5572-78.
- Andrews SC, Robinson AK: Rodríguez-Quiñones, F. Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol Rev. 2003; 27: 215–37.
- Wong C, Richardson DR: Beta-thalassaemia: emergence of new and improved iron chelators for treatment. Int J Biochem Cell Biol. 2003; 35: 1144–9.
- 8) Kishimoto S, Nishimura S, Hattori A, Tsujimoto M, Hatano M, Igarashi M, Kakeya H: Chlorocatechelins A and B from *Streptomyces* sp.: new siderophores containing chlorinated catecholate groups and an acylguanidine structure. Org Lett. 2014; 16: 6108–11.
- Kishimoto S, Nishimura S, Hatano M, Igarashi M, Kakeya H: Total synthesis and antimicrobial activity of chlorocatechelin A. J Org Chem. 2015; 80: 6076–82.
- 10) Giessen TW, Franke KB, Knappe TA, Kraas FI, Bosello M, Xie X, Linne U, Marahiel MA: Isolation, structure elucidation, and biosynthesis of an unusual hydroxamic acid ester-containing siderophore from *Actinosynnema mirum*. J Nat Prod. 2012; 75: 905–14.
- 11) Kishimoto S, Nishimura S, Kakeya H: Total synthesis and structure revision of mirubactin, and its iron binding activity. Chem Lett. 2015; 44: 1303–5.
- 12) Lu S, Nishimura S, Hirai G, Ito M, Kawahara T, Izumikawa M, Sodeoka M, Shin-ya K, Tsuchida T, Kakeya H: Saccharothriolides A–C, novel phenyl-substituted 10-membered macrolides from a rare actinomycete *Saccharothrix* sp. Chem Commun. 2015; 51: 8074–7.
- 13) Lu S, Nishimura S, Ito M, Tsuchida T, Kakeya H: Isolation and structure elucidation of

- cytotoxic saccharothriolides D to F from a rare actinomycete *Saccharothrix* sp. and their structure-activity relationship. J Nat Prod. 2016; 79: 1891–5.
- 14) Lu S, Nishimura S, Takenaka K, Ito M, Kato T, Kakeya H: Discovery of presaccharothriolide X, a retro-Michael product of saccharothriolide B, from the rare actinomycete *Saccharothrix* sp. A1506. Org. Lett. 2018; 20: 4406–10.
- 15) Lu S, Nishimura S, Ito M, Kato T, Kakeya H: Precursor-directed in situ synthesis of saccharothriolides G and H by the actinomycete Saccharothrix sp. A1506. J Antibiot. 2017; 70: 718–20.
- 16) 新学術領域研究「化学コミュニケーションの フロンティア」・領域ホームページURL: http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/fr_chemcomm

Natural products-inspired chemical biology toward development of new antibiotics

Hideaki Kakeya

Department of System Chemotherapy and Molecular Sciences
Division of Bioinformatics and Molecular Sciences
Graduate School of Pharmaceutical Sciences
Kyoto University
Sakyo-ku, Kyoto 606–8501, Japan
scseigyo-hisyo@pharm.kyoto-u.ac.jp

Infectious diseases caused by antibiotic-resistant bacteria has greatly increased and brought a recent public health crisis worldwide. Therefore, it is requisite to develop new antibiotics with a novel pharmacophore or molecular target. In this review, chemistry and antimicrobial properties of new microbial metabolites, tumescenamide C, chlorocatechelins, and saccharothriolides, as pharmaceutical leads produced by actinomycetes such as *Streptomyes* sp. and the rare actinomycete *Saccharothrix* sp. are summarized. In addition, precursor-directed *in situ* synthesis (PDSS) to obtain new derivatives of microbial metabolites in one pot is also described.