

## 2018 (平成30) 年度 北陸大学特別研究助成金【 奨励・若手・女性・挑戦的 】 成果報告書

北 陸 大 学  
学 長 殿

代表者	所属	薬学	職位	講師	氏名	佐藤 友紀
-----	----	----	----	----	----	-------

研究課題名	ポリミキシンB誘導体を用いた新規緑膿菌感染症治療薬の開発研究
-------	--------------------------------

交付額	800,000	円
-----	---------	---

**研究成果の概要**

本研究では、PMB<sub>3</sub>の構造をベースとし、構造中塩基性アミノ酸を水溶性アミノ酸に置換した誘導体を合成し、抗菌活性、LPS結合活性、細胞毒性の検討を行った。3種の菌に対する抗菌活性を検討する中で、特に5位アミノ酸残基の重要性について明らかにした。緑膿菌の抗菌活性については、水溶性アミノ酸に置換した誘導体の抗菌活性は、有意ではないものの活性の低下傾向がみられたが、9位をSer残基に置換した誘導体では、PMB sulfateと同等の抗菌活性を保持し、毒性についても軽減されることが明らかとなった。これらの知見は、今後のPMBの構造活性相関研究で有効性・安全性の高いPMB誘導体の開発をする上で有用であると考えられる。

**研究目的** 研究開始時の背景・着想に至った経緯などを含めて目的を記入して下さい。

**背景**—感染症治療において、抗菌薬を用いた化学療法は、病原体を排除する根治的な治療法として重要である。しかしながら、近年、既存の抗菌薬では効果を示さない耐性菌の出現が数多く報告され社会問題となっている。中でも、3系統の主要な抗菌薬に耐性を獲得した緑膿菌は、多剤耐性緑膿菌と呼ばれ、現在、国内で承認されている有効な薬剤は、ポリミキシン類のコリスチンメタンスルホン酸ナトリムの1剤のみである。また、最後の砦とされているコリスチンも、腎機能障害や神経毒性などの副作用発現の問題を抱えている。

**着想に至った経緯及び研究内容**—抗菌薬の開発は、耐性菌の発現といたちごっこであり、莫大な資金を投じてでも開発の数年後に無効となることも多い。新規緑膿菌感染症治療に関する研究は、注目されているが、今のところ有効な抗菌薬の開発は進んでいない。ポリミキシンB (PMB)は、10アミノ酸残基からなる環状ペプチドであり、分子中に、異常アミノ酸である $\alpha, \gamma$ -diaminobutyric acid (Dab) 残基を6残基含み、またN-末端アミノ基は、脂肪酸で修飾された特徴的な構造を持つ。PMBは腎毒性など毒性の課題はあるものの、グラム陰性菌に対し強い抗菌活性を有すること、さらに菌体内毒素LPSに結合し、内毒素中和作用も有する特徴を持つ。作用メカニズムから、耐性を比較的生じにくい利点もある。

これらのことから、PMBを新規緑膿菌治療薬の開発のリード化合物とする着想に至った。本研究では、PMBのアラニン・スキヤニング法をはじめとしたPMB構造中のアミノ酸残基の側鎖の役割に関する知見を基に、水溶性アミノ酸を導入した誘導体を合成し、低毒性かつ緑膿菌に対する抗菌活性も有した、新規抗菌薬の開発を目的とした。また、グラム陰性菌による感染症で問題となる、LPS中和活性についても検討した。

**研究の方法**

PMB誘導体の合成は、自動ペプチド合成機を用いたFmoc固相合成法により行った。合成した直鎖保護ペプチドにTFA処理をし、保護基の選択的除去および樹脂からのペプチド鎖の切断を行い、DPPAを用いて環化を行った。最終脱保護の後、生成物をToyopearl HW-40カラムで溶出、HPLCにより精製を行った。目的物は、質量分析により確認を行った。本研究では、PMB<sub>3</sub>のDab残基に水溶性アミノ酸である、Ser及びHseを導入した誘導体を合成した。

合成PMB誘導体の抗菌活性は、大腸菌、ネズミチフス菌及び緑膿菌を用い、日本化学療法学会標準法に規定されている微量液体希釈法により、最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) を測定した。緑膿菌に対して高活性を示した誘導体については、多剤耐性緑膿菌を用いた抗菌活性についても測定を行い、効果の判定を行った。

LPS結合活性の測定法は、displacement assay法により行う(Moore RA et al, Antimicrob Agents Chemother, 29, 496-500, 1986)。本研究では、PMB<sub>3</sub>の1位Dab残基の側鎖N<sup>γ</sup>-アミノ基に5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl-Gly (DNS-Gly) を導入した [Dab(DNS-Gly)]<sup>1</sup>-PMB<sub>3</sub>を蛍光標識体として用い、誘導体のLPSに対する結合活性を評価する。

合成PMB誘導体の細胞毒性の測定は、MTT assay法により評価を行った。

## 研究成果

引用文献は文末に<引用文献>として記入して下さい。

### ①PMB誘導体のデザインおよび合成

本研究で使用したPMB誘導体は、過去報告済みの方法を用いて自動ペプチド合成機によるFmoc固相合成法により行った<sup>1)</sup>。生成物をToyopearl HW-40カラムで溶出、HPLCにより精製を行い、目的物の確認は質量分析により行った。ペプチドのデザインは過去の知見をもとに、抗菌活性を保持しながら毒性の軽減を目し、PMB<sub>3</sub>構造中のDab残基の代わりに水溶性アミノ酸である、Ser及びHseを導入にした誘導体を合成し、抗菌活性、LPS結合活性、細胞毒性の測定に使用した<sup>1,2)</sup> (Figure 1)。対照として、PMB sulfate(Sigma)を使用した。

### ②合成PMB誘導体の抗菌活性

抗菌活性の結果をTable 1に示した。今回合成したPMB誘導体の抗菌活性は、抗菌活性に重要とされるDab残基を水溶性アミノ酸残基に置換していることから、抗菌活性の低下が予測される。しかしながら、いくつかの誘導体はPMB sulfateと同等の抗菌活性を保持する結果を得た。これらの誘導体の中で、5位をSerに置換した誘導体は、大腸菌、ネズミチフス菌への抗菌活性が有意に低下し、MICは8 nmol/mLと有意であった。また5位をHseに置換した誘導体は、大腸菌と緑膿菌の抗菌活性を低下させた。これらの結果は、PMBの5位のDab残基は抗菌活性に必須であることを示している。1位、3位、8位をSerに置換した誘導体と3位と8位をHseに置換した誘導体では、塩基性の低下にもかかわらず大腸菌とネズミチフス菌への抗菌活性は、PMB sulfateと同等の活性を保持していた。

### ③合成PMB誘導体のLPS結合活性測定

LPS結合活性の測定法は、Dab残基の代わりに、Ser、Hse残基置換した誘導体では、いずれにおいても結合活性は大きく減少した。LPSの結合におけるアミノ基の重要性が示唆された。

### ④合成PMB誘導体の細胞毒性の測定

合成したPMB誘導体の細胞毒性については、合成した誘導体はいずれもPMB sulfateに比較し細胞毒性は低下していることが明らかとなった。特に3位をHseに置換した誘導体で毒性の大きな低下がみられた。本研究では、PMB<sub>3</sub>の構造をベースとした誘導体を合成し、抗菌活性、LPS結合活性、細胞毒性について検討を行った。その結果、3種の菌に対する抗菌活性に必要な部位を明らかにした。また、緑膿菌については、水溶性アミノ酸に置換した誘導体の抗菌活性は、有意ではないものの活性の低下傾向がみられたが、9位をSer残基に置換した誘導体では、PMB sulfateと同等の抗菌活性を保持し毒性の低下がみられた。これらの知見は、今後のPMBの構造活性相関研究で有効性・安全性の高いPMB誘導体の開発をする上で有用であると考えられる。

<引用文献>

1. Sakura, N., Itoh, T., Uchida, Y., Ohki, K., Okimura, K., Chiba, K., Sato, Y., and Sawanishi, H. (2004) Bull. Chem. Soc. Jpn., 77, 1915-1924.
2. Sato, Y., Shindo, M., Sakura, N., Uchida, Y., and Kato, I. (2011) Chem. Pharm. Bull., 59, 597-602.

Table 1 MIC of PMB sulfate and synthetic Polymyxin B<sub>3</sub> analogs.

	MIC (nmol/mL)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PMB sulfate	1	1	1
(1) [Ser <sup>1</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	1	1	2
(2) [Ser <sup>2</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	1	1	2
(3) [Ser <sup>3</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	8	8	2
(4) [Ser <sup>4</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	1	1	2
(5) [Ser <sup>5</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	4	1	1
(6) [Hse <sup>1</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	2	1	2
(7) [Hse <sup>3</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	1	1	2
(8) [Hse <sup>8</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	4	2	4
(9) [Hse <sup>9</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	1	1	2
(10) [Hse <sup>10</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	4	1	2

Peptides	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(1) [Ser <sup>1</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	n-Octanoyl-Ser	Thr	Dab	Dab*	Dab	D-Phe	Leu	Dab	Dab	Thr*
(2) [Ser <sup>2</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	n-Octanoyl-Dab	Thr	Ser	Dab*	Dab	D-Phe	Leu	Dab	Dab	Thr*
(3) [Ser <sup>3</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	n-Octanoyl-Dab	Thr	Dab	Dab*	Ser	D-Phe	Leu	Dab	Dab	Thr*
(4) [Ser <sup>4</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	n-Octanoyl-Dab	Thr	Dab	Dab*	Dab	D-Phe	Leu	Ser	Dab	Thr*
(5) [Ser <sup>5</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	n-Octanoyl-Dab	Thr	Dab	Dab*	Dab	D-Phe	Leu	Dab	Ser	Thr*
(6) [Hse <sup>1</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	n-Octanoyl-Hse	Thr	Dab	Dab*	Dab	D-Phe	Leu	Dab	Dab	Thr*
(7) [Hse <sup>3</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	n-Octanoyl-Dab	Thr	Hse	Dab*	Dab	D-Phe	Leu	Dab	Dab	Thr*
(8) [Hse <sup>8</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	n-Octanoyl-Dab	Thr	Dab	Dab*	Hse	D-Phe	Leu	Dab	Dab	Thr*
(9) [Hse <sup>9</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	n-Octanoyl-Dab	Thr	Dab	Dab*	Dab	D-Phe	Leu	Hse	Dab	Thr*
(10) [Hse <sup>10</sup> ]-PMB <sub>3</sub>	n-Octanoyl-Dab	Thr	Dab	Dab*	Dab	D-Phe	Leu	Dab	Hse	Thr*

\*: amide linkage between γ-NH<sub>2</sub> of Dab\* and α-COOH of Thr<sup>10</sup>

Figure 1 Structures of Polymyxin B<sub>3</sub> Analogs with Hydroxy Amino Acids Substituting for its Diamino Butyric Acid Residues.

## 主な発表論文等

論文・学会・HP等の発表があれば、項目ごとに記入して下さい

### 学会発表

Yuki Sato, Naoki Sakura, Tatsuo Takahashi, Keiko Okimura, Masakazu Miura, Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Tohru Mochizuki

10th International Peptide Symposium / The 55th Japanese Peptide Symposium 2018年12月

### 著書

Yuki Sato, Naoki Sakura, Tatsuo Takahashi, Keiko Okimura, Masakazu Miura, Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Tohru Mochizuki

Peptide Science 2018: Proceedings of the 10th International Peptide Symposium / The 55th Japanese Peptide Symposium Shiroh Futaki and Katsumi Matsuzaki (Editors) The Japanese Peptide Society, 2019