

氏名（本籍）	はまだ けいすけ 濱田 圭佑（鹿児島県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 288 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ネガマイシン天然類縁体を基盤とした新規高活性リードスルー誘導体の創製とその作用機構解析における基礎的研究
論文審査委員	（主査） 教授 林 良雄 教授 三浦 剛 教授 馬場 広子

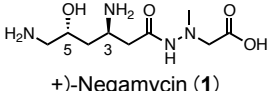
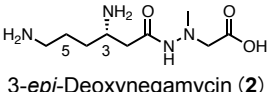
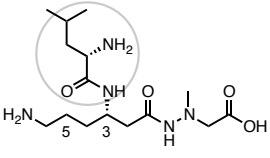
論文内容の要旨

デュシェンヌ型筋ジストロフィーをはじめとする遺伝性疾患の約 20%はナンセンス変異に起因する。近年、その治療法として、当該ナンセンス変異により生じる中途終止コドン（PTC）を読み飛ばし（リードスルー）、機能を有する完全長タンパク質を発現させる試みが注目を集めている。1970 年に *Streptomyces purpeofuscus* から単離されたヒドラジド構造を有するジペプチド様抗生物質、(+)-Negamycin (**1**) もリードスルー活性を有する化合物の一つである。

これまでに著者らは、(+)-Negamycin (**1**) からの誘導により、3-*epi*-Deoxynegamycin (**2**) および Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**3**) が **1** よりも高いリードスルー活性を有することを見出した (Table 1)。これら誘導体は、1977 年に *Streptomyces goshikiensis* より単離され、抗菌活性を示さないことから薬効未知として報告された天然有機化合物と同一である。つまり、当該誘導体はリードスルー活性と抗菌活性との薬効分離に成功した化合物であることが明らかとなった。

そこで、本研究では、医薬候補化合物の創出のために **2** および **3** を基盤とした構造活性相関研究を展開し、さらなる高活性誘導体の獲得を目指した。第 1 章では、**2** の主鎖炭素鎖長並びに末端カルボン酸部位に焦点を当てた誘導体の合成・生物活性評価を、第 2 章では、**3** の 3 位アミノ基部に着目した構造変換を実施した。一方、高活性誘導体の獲得に必要なネガマイシン類のリードスルー活性発現に寄与する標的分子、並びにその結合部位は未だ明らかとなっておらず、リードスルーの発現メカニズムは十分に解明されていない。そこで第 3 章ではネガマイシン誘導体の作用機構解析を目的として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用

Table 1.

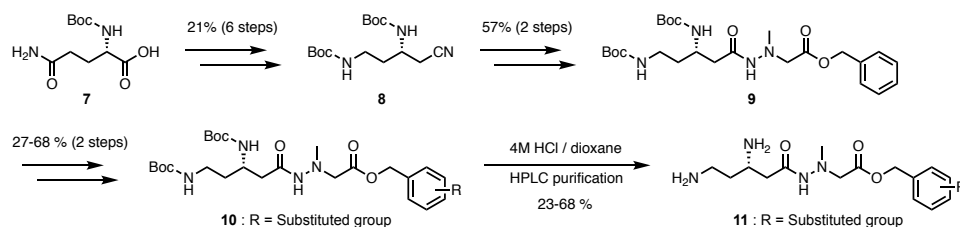
Compound	Readthrough activity ^{a)}
 (+)-Negamycin (1)	1.44 ± 0.05
 3- <i>epi</i> -Deoxynegamycin (2)	2.37 ± 0.08
 Leucyl-3- <i>epi</i> -deoxynegamycin (3)	2.42 ± 0.02

a) Relative readthrough activity as compared to control (= 1).
Compounds : 200 μM, Cell : COS-7

いた遺伝学的解析研究を実施した。

第 1 章 3-*epi*-deoxyneigamycin の主鎖及び末端カルボン酸に着目した誘導体の合成と生物活性評価

2 を基盤とした構造活性相関研究を実施するにあたり、本章では 1) β -アミノ酸残基の側鎖



Scheme 1.

炭素鎖長の変更および 2) α -アミノ酸への変換に関する誘導体の設計、合成を実施した。さらに、3) 得られた高活性誘導体の末端カルボン酸をエステル構造、アミド構造へ変換した誘導体の設計・合成を実施した。合成誘導体については、COS-7 細胞を用いてリードスルー活性の評価を行った。本評価系では、PTC (ナンセンス配列 : TGA) の前後に β -galactosidase および luciferase 活性発現配列を有するデュアルレポータープラスミドを用いた。両酵素の活性値を測定後、luciferase 活性値を β -galactosidase 活性値で除した値をリードスルー活性値とし、化合物無添加コントロールに対する比活性としてリードスルー活性を算出した。その結果、2 の主鎖炭素鎖長を 1 つ短縮した TCP-112 (4) に、既存のネガマイシン誘導体を凌駕する高いリードスルー活性が有ることを明らかとした。一方、ネガマイシン中の β -アミノ酸構造を α -アミノ酸へ変換すると活性が大幅に減弱することも明らかとした。

次に、4 の末端カルボン酸をエステルおよびアミド構造へと変換した誘導体を設計、合成した。生物活性評価の結果、ベンジルエステル誘導体 5 は活性を維持した。一方で、ベンジルアミド誘導体 6 はその活性が消失した (Table 2)。そこで、誘導体 5 をもとに、ベンゼン環上に各種置換基を導入し、エステル部での構造活性相関研究を展開した (Scheme 1)。置換基およびその位置の検討において、臭素置換体では、オルト位置置換体である 11a にて活性の維持が確認できた。加えて、塩素置換体ではメタ位置置換体 TCP-182 (11b) において TCP-112 (4) を凌ぐ活性の向上が確認された。

11b の活性向上のメカニズムを解明することを目的として、新たに human cell lysate を用いた無細胞タンパク質合成評価系を構築し、リードスルー活性を評価した。ネガマイシン誘導体は、高極性分子であるため細胞膜透過性は低いと考えられる。そのため、本評価系は誘導体の細胞膜透過能を加味しない活性値の算出が可能である。COS-7 細胞での評価において TCP-112 (4) を凌ぐリードスルー活性を示した 11b は、本無細胞評価系において、その活性値は化合物未添加群付近ま

Table 2.

Compound	Structure	Readthrough activity ^a
TCP-112 (4)		4.26 ± 0.02
5		4.04 ± 0.06
6		0.80 ± 0.05
11a		3.83 ± 0.56
TCP-182 (11b)		4.90 ± 0.21

^a Relative readthrough activity as compared to control (= 1).
Compounds : 200 μ M, Cell : COS-7

で大幅に減少していた (**Figure 1**)。加えて、ブタ肝臓由来エステラーゼを用いた加水分解によって、**11b** は速やかに分解を受け活性本体である TCP-112 (**4**) を生成することが明らかになった。以上の結果から、エステル構造への変換により活性の向上が見られたのは、化合物自体の活性増強ではなく、脂溶性が向上した担体性 prodrug として機能し、細胞内への透過効率が改善されたためと考えられた。

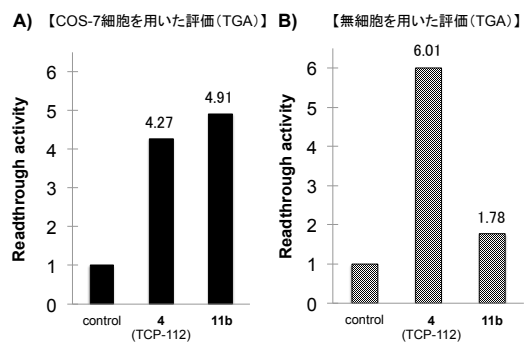
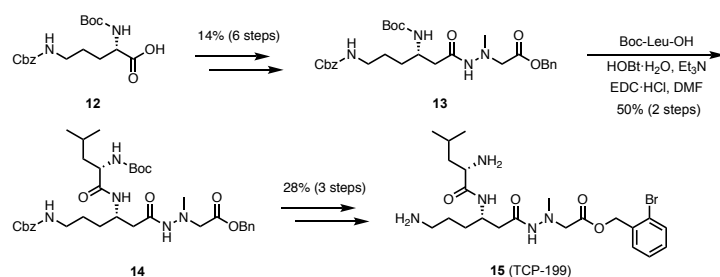


Figure 1.

第2章 Leucyl-3-*epi*-deoxyneomycin の3位アミノ基および末端カルボン酸部位に着目した誘導体の合成と生物活性評価

Leucyl-3-*epi*-deoxyneomycin

(**3**) を基本骨格として3位アミノ基のロイシン構造に着目した構造活性相関研究を展開することで、高活性な誘導体の獲得を図った (**Scheme 2**)。3のロイシン構造を各種アミノ酸に変換した誘導体を合成後、生物活性評価を実施したものの、3を凌ぐ誘導体



Scheme 2.

の獲得には至らなかった。しかしながら、末端カルボン酸部位に第1章と同様のエステル化誘導を施したところ、親化合物である TCP-126(**3**)の活性を大幅に改善した誘導体 TCP-199(**15**)の獲得に至った。また、**15**は10 μMから200 μMにおいて濃度依存的な活性を示すことが明らかとなった (**Figure 3**)。これは、最も高活性な天然由来リードスルー化合物であるアミノグリコシド G418の活性をも凌ぐものであった。

in vivo におけるリードスルー活性評価には、第1章でリードスルー活性評価に用いたデュアルレポータープラスミドを導入したトランスジェニックマウス (READ マウス) を用いた。生理食塩水に溶解した化合物 **15** を、READ マウスの腹部領域に 1 mg/day/20 g の用量で7日間皮下投与した。コントロールとして生理食塩水を、陽性コントロール群にはアミノグリコシド系抗生物質であるアルベカシンを用いた。その結果、**15** 投与群は、アルベカシン (ABK) 投与群に比べやや活性が劣るものの、*in vivo* においても有意なリードスルー活性を有することが明らかとなった (**Figure 4**)。さらに、B10 マウスの腹部領域に 10 mg/day/20 g の用量で単回皮下投与し、14日間の体重変化に基づき毒性評価を実施した。その結果、化合物 **15**

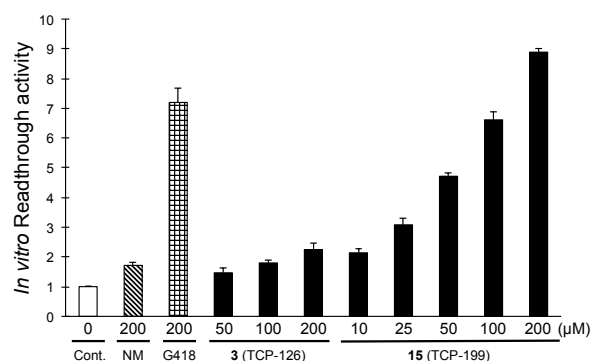


Figure 3.

投与群は、投与後 1 日目においてわずかな体重の減少が見られたものの、その後は化合物未添加群と同様の体重変化が観察された。以上の結果から、**15** の急性毒性は比較的 low、ナンセンス変異性疾患治療における長期投与に適応しうる可能性が示唆された。

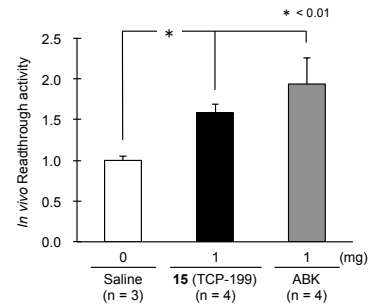


Figure 4.

第 3 章 ネガマイシン作用機構解析に資する多剤超感受性酵母株の構築と遺伝学的解析研究

知念らにより構築された酵母株 *12geneΔHSR* は、薬剤排出系に関わる 12 遺伝子を破壊するとともに胞子形成能を向上させることにより、遺伝学的解析に必要な形質転換能、接合能、胞子形成能を維持したまま多くの薬剤に対し高い薬剤感受性を示す多剤超感受性酵母である。そこで、この *12geneΔHSR* を用い、ネガマイシン誘導体の作用機構解析、およびリードスルー活性評価に有効な酵母株の構築を行った。即ち、本誘導体のナンセンス変異標的指向性の検討、および出芽酵母でのリードスルー活性評価系の確立を目的として、*12geneΔHSR* のアデニン合成遺伝子 *ADE2* へ PTC 変異 (*TGA, TAG, TAA*) の導入を行った。このナンセンス変異含有酵母株はアデニンが不足した培地では赤色を呈するがリードスルーが起こると白くなることから、定性的に当該活性の有無を判別可能である (Figure 5)。

TGA 配列を導入した酵母株 (YKH-002) にネガマイシン誘導体 (Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**3**))、TCP-112 (**4**) および G418 を作用させると本来赤色であった酵母が白色に変化することが明らかとなり、本酵母株がリードスルー作用機構解析に有用であることが示された。さらに、本酵母株を用い、ネガマイシン誘導体に対するリードスルー耐性株を単離することに成功した。耐性株のゲノムリ

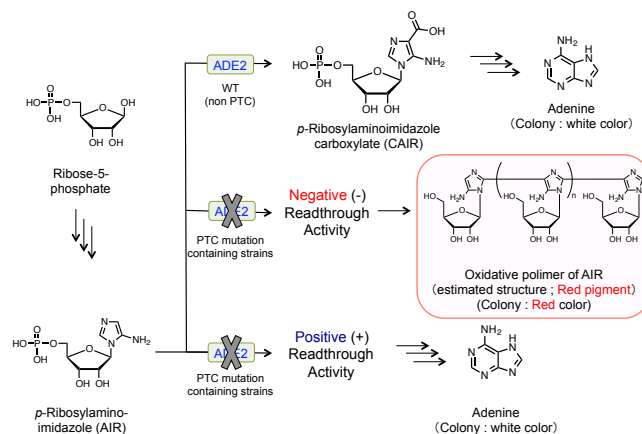


Figure 5.

シーケンスを実施した結果、27 個の遺伝子に 1 アミノ酸変異を含む種々の変異が挿入されていることを確認した。それら遺伝子の中にはネガマイシンの細胞内導入に関与するトランスポーターをコードする遺伝子も含まれており、実際に YKH-002 においてその遺伝子を破壊すると、ネガマイシンの細胞内導入が妨げられることも確認できた。以上のことから、本酵母株はネガマイシン誘導体の作用機構解析に有用であり、他のリードスルー化合物の作用機構解析にも応用可能なツールとなりうる可能性が示唆された。

本研究では、ネガマイシン天然類縁体 (3-*epi*-Deoxynegamycin (**2**), Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**3**)) の主鎖炭素鎖長、3 位アミノ基部、並びに末端カルボン酸部位に着目した構造活性相関研究を展開した。その結果、TCP-182 (**11b**), TCP-199 (**15**) の獲得に至り、**15** においては既存の高活性リードスルー化合物 G418 を凌駕する、強力なリードスルー活性を有することが明らかとなった。さらに **15** は、*in vivo* 投与においても顕著な急性毒性は示さず、ナンセンス変

異性疾患の治療に有用な医薬候補化合物となる可能性が示唆された。一方、出芽酵母中のアデニン合成遺伝子 *ADE2* へ各種 PTC 変異を導入した多剤超感受性酵母株の構築にも成功し、ネガマイシン誘導体のリードスルー活性発現メカニズムの解析に有用であることも示された。これらの成果は、多くの難病を含む Unmet Medical Needs の高いナンセンス変異性遺伝性疾患を克服する新規化学療法の新規創出に繋がることから、大変意義深いものである。

【研究結果の掲載誌】

1. A. Taguchi, **K. Hamada**, Y. Hayashi, *et al.*, *ChemMedChem*, **9**, 2233-2237 (2014).
2. **K. Hamada**, A. Taguchi, Y. Hayashi, *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, **6** (6), 689-694 (2015).
3. A. Taguchi, **K. Hamada**, Y. Hayashi, *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, **8** (10), 1060-1065 (2017).

論文審査の結果の要旨

濱田圭佑氏の博士学位申請論文は、ジペプチド様抗生物質(+)-Negamycin(1)の天然類縁体 3-*epi*-Deoxynegamycin(2)および Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin(3)を基盤とした高活性リードスルー化合物の創製研究、およびその作用機構解析における基礎的研究である。デュシェンヌ型筋ジストロフィーをはじめとする各種遺伝性疾患の約 20 %はナンセンス変異 (PTC) に起因することが知られているが、画期的な治療法は存在しない。したがって PTC を読み飛ばす (リードスルー) 化合物の創製、およびその作用機構の解明は、ナンセンス変異型遺伝性疾患を克服する新規化学療法創成の基盤を確立できる可能性がある。濱田氏は、3-*epi*-Deoxynegamycin(2)および Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin(3)の主鎖炭素鎖長、3 位アミノ基部、並びにカルボン酸部位に着目した構造活性相関研究を展開した。その結果、高活性誘導体 TCP-182(4)、TCP-199(5)の獲得に至り、5 においては既存の高活性リードスルー化合物 G418(6)を凌駕する、強力なリードスルー活性を有することを明らかにした。さらに本化合物は、*in vivo* 投与において顕著な急性毒性が観察されず、ナンセンス変異性疾患の治療に有用な医薬候補化合物となる可能性を示唆した。一方、出芽酵母中のアデニン合成遺伝子 *ADE2* へ各種 PTC 変異を導入した多剤超感受性酵母株の構築にも成功した。続く遺伝学的解析研究により、ネガマイシン誘導体の細胞内取り込み機構に関与する遺伝子の同定に成功し、自ら創製した本酵母株がリードスルー活性発現メカニズムの解析研究に有用であることを示した。濱田氏の博士学位申請論文は、これらの研究成果を 3 章に亘ってまとめたものである。

第 1 章では、3-*epi*-Deoxynegamycin(2)に着目した構造変換により、 β -アミノ酸残基の側鎖炭素鎖長の変更、および α -アミノ酸への変換に関する誘導体の設計・合成を実施した。その結果、2 の主鎖炭素鎖長を 1 つ短縮した TCP-112(7)が、既存のネガマイシン誘導体を凌駕する高いリードスルー活性を有することを明らかとした。さらに、得られた高活性誘導体 7 のカルボン酸を、エステル構造およびアミド構造へ変換した誘導体を設計・合成した。その結果、より高いリードスルー活性を有するメタクロロベンジルエステル誘導体 TCP-182(4)を見出した。さらに、無細胞タンパク質合成系における活性評価、およびエステラーゼ加水分解実験の結果、当該エステル構造の導入による活性向上は、化合物自体の活性増強ではなく、脂溶性の向上と共に担体性 *prodrug* として機能することで、細胞内への透過効率が改善されたためであると結論づけた。

第 2 章では、Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin(3)を基本骨格として 3 位アミノ基部のロイシン構造、およびカルボン酸部位に着目した構造活性相関研究を展開することで、高活性な誘導体の獲得を図った。その結果、高活性誘導体 TCP-199(5)を見出した。5 は、10–200 μM において濃度依存的な活性を示した。また本活性は、最も高活性な天然由来リードスルー化合物であるアミノグリコシド G418(6)の活性をも凌ぐことを明らかとした。一方で 5 は、*in vivo* 評価において陰性対照群と比較し有意なリードスルー活性を示すとともに、顕著な急性毒性を示さなかったことから、ナンセンス変異性疾患の治療に有用な医薬品候補化合物となる可能性が示唆された。

第 3 章では、ネガマイシン誘導体の作用機構解析を目的として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた遺伝学的解析研究を展開した。まず、出芽酵母でのリードスルー活性評価系を

確立すべく、多剤超感受性酵母株 *12geneΔHSR* のアデニン合成遺伝子 *ADE2* に PTC 変異(*TGA*, *TAG*, *TAA*) を導入した。当該変異株では、アデニン不足培地では赤色を、リードスルーが起こると白色になることを意図した。実際に、ネガマイシン誘導体存在下では、白色への変化が観察され、リードスルー活性を定性的に評価できる酵母株の構築に至った。さらに、本酵母株を用いて、ネガマイシン誘導体に対するリードスルー耐性株の単離に成功した。耐性株の全ゲノムシーケンスから、約 20 遺伝子に 1 アミノ酸変異を含む種々の変異の挿入を確認した。殊に、ネガマイシンの細胞内移送に関与するトランスポーター関連遺伝子が複数含まれており、該当遺伝子の破壊が、ネガマイシン誘導体の細胞内導入の障害に繋がることを確認した。以上のことから、本酵母株はネガマイシン誘導体の作用機構解析に有用であることが示唆された。さらに、本酵母株はネガマイシン誘導体に限らず、他のリードスルー化合物全般の作用機構解析にも応用可能であり、汎用性を有する研究ツールとしても、今後当該分野の科学に貢献できるものである。

以上、濱田氏の博士学位申請論文は、難病を含む多くのナンセンス変異型遺伝性疾患を克服する新規化学療法の創出に繋がる有益な科学的知見並びに研究ツールの提供に繋がるものであり、臨床薬学の基盤形成の観点から有意義な成果と貢献を果たした研究と言える。したがって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として相応しい内容を有するものと判断する。