

環状化合物がとることができる立体構造の配置空間(2)

エリスロマイシンへの応用と X 線結晶構造

後藤 了^{1,2}、小松和志³

¹ 国際医療福祉大薬学部、² 東京理科大学 DDS 研究センター、³ 高知大学理学部

本研究の目的は、医薬品や天然化合物の立体構造探索計算の網羅性を明らかにすることである。網羅性が保障されれば、分子内エントロピー変化の絶対量と対応づけることが可能となる。

1. 大環状化合物の構造活性相関

抗生物質は微生物が産生する抗菌剤とその誘導体を指し、合成抗菌剤と区別される。カビ類に由来するβ-lactam 系抗生物質と、放線菌類に由来する macrolide 系はじめ 4 種の抗生物質とがある。抗生物質の開発は、本邦伝統の発酵技術を背景に戦後国内製薬メーカーの牽引力となり、国際競争力と開発効率の実績を残し、かつ感染症治療薬への需要は絶大である。

Erythromycin A (EMA) は macrolide 系抗生物質で、14 員環 lactone 骨格を有する。D-desosamine と L-cladinose のグリコシド体で、糖を切除したものはアグリコンという。放線菌由来の抗生物質は細菌に作用するのに加

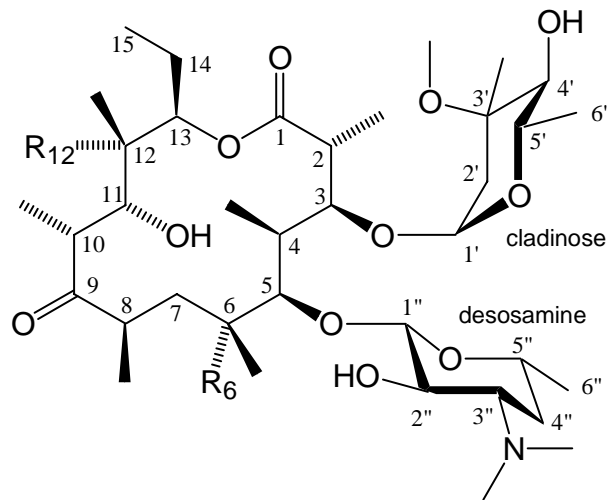
えマイコプラズマやクラミジアにも効果を持つ利点がある。しかし、EMA は胃酸で分解されやすく、肝薬物代謝酵素 CYP3A4 で代謝を受け、ここで競合する医薬品は併用禁忌である。これらの欠点に対策し、胃内安定性を目指した clarithromycin (CAM) や EMA ethylsuccinate ester が開発され、また消化器症状改善・持続性・抗菌スペクトル変更等の目的で azithromycin (AZM) や telithromycin (TEM) など数多くの実用医薬品へと発展した。さらに、長期少量投与による炎症治療など抗菌と異なる作用との活性構造分離が試みられている。

抗生物質に限らず、大環状天然化合物の薬理作用や低分子プローブの生化学的機能は非常に複雑である。また、半合成と呼ばれる誘導体合成が難しい。しかし、合理的な構造活性相関の手だてが見つかっておらず、未知の領域として挑戦が繰り返されている。

2. EMA の立体構造

EMA とその誘導体の立体構造は CSD に 2 種の結晶多形含む 17 件、PDB に 8 件が公開されている。なお、PDB のものはグリコシドの細菌リボソーム RNA との複合体と、アグリコンと酵素 cytochrome P450 との複合体がある。後者は CYP3A4 ではなく菌類由来の合成系酵素である。

EMA の NMR 測定では、1969 年に 7 位炭素に 2 種類の立体構造の共存が見いだされており、



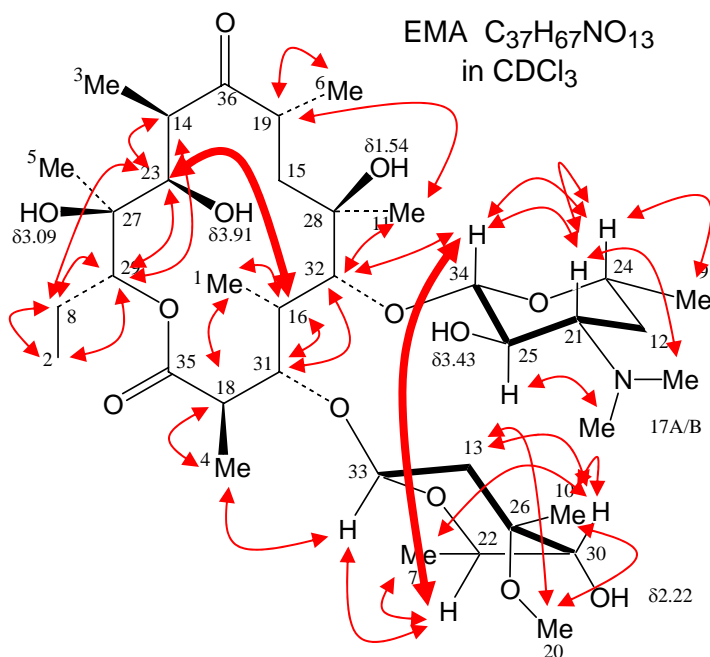
$R_6=R_{12}=\text{OH}$, erythromycin A (EMA)

$R_6=\text{OH}$, $R_{12}=\text{H}$, erythromycin B (EMB)

$R_6=\text{OMe}$, $R_{12}=\text{OH}$, clarithromycin (CAM)

また 1975 年にはグリコシドとアグリコンでの立体構造の違いが指摘されている。

CDCl₃ 溶媒中の ¹³C-NMR スペクトルではジメチルアミンの重複 (第 17 シグナル) にて 36 シグナルが分離され、 δ 順にナンバリングし、HETCOR, HSQC, HH-COSY, HMBC スペクトルからアサインした (右図)。さらに、NOESY 測定で矢印に示す相関ピークを得た。C4 位 (第 16 シグナル) と C11 位 (第 23 シグナル)、および desosamine 5 位 (第 22 シグナル) と cladinose 1 位 (第 34 シグナル) に結合した水素の間に強い相関が確認された。

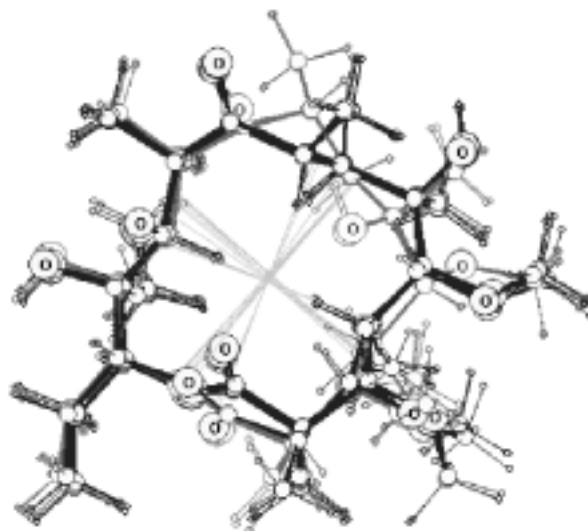


また、極性の CD₃OD 中における HH-COSY スペクトルでは、いくつかの水素について 4 種類ずつの相関ピークが確認された。これは極性溶媒での構造変化時間の遅延によるもので、最少 4 種の立体構造の共存を示唆する。

3. EMA 構造の計算とクラスター分析

EMA アグリコンの立体構造の探索計算を行った。得られた 4075 の立体構造につき、クラスター分析を行い、14 員環部分で 10 クラスターを得た。

図はそれぞれのクラスターについて最安定構造を最小自乗法重ね合わせたものである。ラクトン構造は図の下方にある。C4 位と C11 位の水素は互いに接近しており、NOESY の結果を反映した。また、C7 位のメチレンにおいて検出可能な構造多様性が見られる点で文献に一致した。



図より、右側にくる C2-C3-C4-C5-C6-C7-C8 の弧において変化が著しく、一方 C9 から C13 までの弧ではほとんど構造に変化が見られないと思われた。

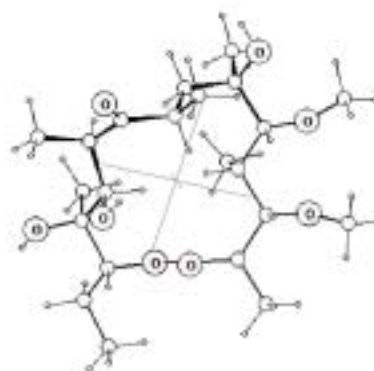
グリコシド体での探索計算では 14 員環の最安定構造がアグリコンと異なることは確認されたが、安定構造のエネルギーが非常に低いようで、30 kcal/mol の範囲内では単一の立体構造だった。

4. EMA 構造の主成分分析

このような構造多様性の偏在がどのような構造的特性によって生じるかについて検討したいと考えた。そこで、全ての立体構造について大環状構造の二面角を求め、その主成分分析を行った。統計の主成分分析では次元の意味が問われるが、ここでは全て同じ二面角データであるから、単

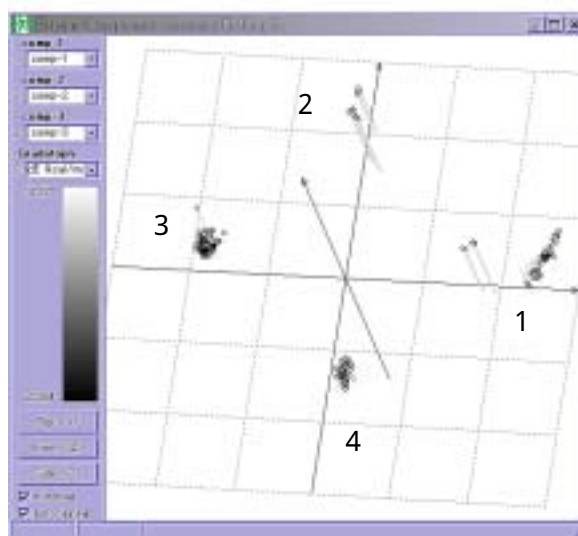
なる固有値問題として、得られる縮約空間は角度の次元の空間となる。

主成分分析によって縮約された空間は、主として3次元であり、ここで立方体の頂点位置に集団が点在した。またこの頂点8個の他に、分布の少ない集団が2カ所見られ、これがクラスター分析で得られた10個の集団に相当することが構成する立体構造から確認された。



ここで、それぞれの立体構造を比較すると、C13~C2のエステル結合部分は平面構造となっており、これが他の二面角とは無関係に反転している場合が多かった。

そこで、C13~C2のエステル結合部分のデータを除いて、改めて主成分分析した。その結果、同じ3次元に縮約されたが、右図のような虫ピングラフとなり、4つの集団が見られた。EMAの分子構造ではエステル部分にはNMRで検出できる部分がないので、4集団の存在はCD₃OD中での観測結果と一致したと見なせる。



右の細長い集合を1、上の少ない集合を2、左の最も大きい集合を3、下の集合を4とした。それぞれのコンフォメーションを比較したところ、集合1と集団2はCSDの単結晶に多く見られた構造、集団3は酵素との複合体、集団4はリボゾームRNAとの複合体において見られた結晶構造にそれぞれ対応した。

5. 立体構造の相互交換性

ここで、それぞれの集合にあるコンフォメーションの構造を比較すると、集団1から集団2へはC7-C8-C9-C10の3結合の回転、集団2から集団3へはC4-C5-C6-C7の3結合の回転、集団3から集団4へはC6-C7,C8-C9-C10の3結合の回転、集団4から集団1へはC4-C5-C6,C7-C8の3結合の回転を行ったものであった。それで、集団1から集団3へ変化するためには、1→2→3という経路で変化するか、1→4→3という経路で変化することと等価であると考えられた。このように構造変換操作の線形性が見られることから、この4つの集団は円環状の相互変換関係にあると解釈されうる。

この結果は、EMAのコンフォメーション変化の配置空間が、シクロペンタンC₅H₁₀と同相の円周構造(1次元の表面S¹)となっていることを意味する。ということは、上記に示したような14員環の結合のうち、3つの結合が協調的に回転することというのが、シクロペンタンにおける2つの結合が回転することで起こるフラッピング変換に対応しているものと考えられる。

一方でC9-C10-C11-C12-C13ではほとんど構造変化は見いだされず、見かけ上1つの固定された結合のように振る舞った。また、C13~C2のエステル結合は、他の結合の協調的な変化とは無関係に反転することができるが、それは全体の構造に影響がほとんどなく、反転したことはコン

フォメーション変化と独立した動きとみなせる。つまり、C13~C2の部分もある意味で1本の結合を見なせるのではないかと考えられた。形式的には14員環であるが、そのいくつかは協調的に動き、いくつかは動かないことによって、最終的に構造変化の自由度が5つしかないと結論づけられた。

6. 環構造の配置空間の階層性

形式的には9以上のメンバー数を持つ大環状構造においても、ただ闇雲に高次元の解析を行わなくてもよい。縮約された空間の主要な次元だけに注目し、また機能的に解析対象を編集することで構造変化の把握に役立つ。これまでに解析可能となった4,5,6,7員環の配置空間 S^0, S^1, S^2, S^3 を用い、多くの環構造を解釈できる。

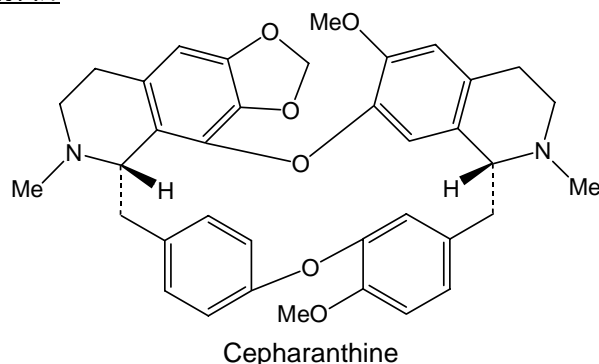
形式的に何員環かということに拘らないなら、二重結合やベンゼン環などの縮合は回転の自由度を低下させるので「頂点」として取り扱うことができる。また、環状ペプチドであればアミド結合(ペプチド結合)部分は3個の結合をまとめて反転およびシス・トランス変換による4つの構造を同一視すれば、1個の「ボンド」として扱うことができる。

さらに、分子内水素結合の存在は著しい自由度の低下となり、これも配置空間を縮約することに寄与があるだろう。このように明白な束縛がなくても、EMA解析の結果に見られたように複数の結合で協調的な挙動もまた配置空間を縮約する寄与がある。

このような仮説を設定し、海洋微生物の産生するポリ環状エーテル型毒素のシガトキシンについて、置換基の導入と環の縮合の有無に伴う5~9員環構造における配置空間の変化(自由度の低下)についての解析を行い、構造観測との対応を検証し、様々なケースの知見を収集した。

7. 環構造の多様性に基づく構造活性相関解析

アルカロイド Cepharanthine は、日本統治下台湾の標高 700 m 以上の高地にて蛇毒治療の民間薬に用いられたツツラフジ科植物 *Stephania cepharantha* Hayata に由来する。Cepharanthine は脱毛治療、放射線治療に伴う白血球減少症の治療に利用されるほか、様々な臨床応用が試みられている。



ここに示した分子構造では立体構造の探索計算が困難である。それでも、実験事実としては誘導体について様々な温度での NMR 解析を行ってみると、環の巻き方に依存した特徴的な立体構造変化を確認、弁別することができる。

我々は前節のような考え方に基いて、縮合ベンゼン環を単一の「頂点」として扱うこととした。また、直鎖構造の構造変化において単位となる変化が単一結合の回転である対して、環構造では経路が2つある鎖と見なすと単位となる変化は2個の結合の協調的な回転であり、これを線形結合することで全ての立体構造を網羅できるものと考えて、環構造探索プログラムを作成した。そこで、cepharanthine 誘導体の解析を試みた。