

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症研究国際展開戦略プログラム  
(英語) Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases (J-GRID)

研究開発課題名：(日本語) 新型多剤耐性菌克服のための新規阻害物質等の探索  
(英語) Screening of novel inhibitors to overcome new multidrug resistant bacteria

研究開発担当者 (日本語) 名古屋大学大学院医学系研究科、教授、荒川宜親  
所属 役職 氏名：(英語) Nagoya University Graduate School of Medicine, Professor, Yoshichika Arakawa

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月 31日

1. 分担研究 (日本語) 新規ドラッグターゲット候補分子の精製と構造および機能解析  
開発課題名：(英語) Purification of new drug-target molecules and characterization of their structure and function

研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学大学院医学系研究科、教授、荒川宜親  
所属 役職 氏名：(英語) Nagoya University Graduate School of Medicine, Professor, Yoshichika Arakawa

分担研究 (日本語) ケミカルスクリーニングによる多剤耐性菌に有効な新規阻害物質の探索  
開発課題名：(英語) Chemical screening of novel small molecules that exhibit inhibitory activities against multi-drug resistant bacteria

研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学トランスフォーメティブ生命分子研究所、  
特任准教授／研究推進主事、佐藤綾人  
所属 役職 氏名：(英語) Institute of Transformative Bio-Molecules, Designated Associate Professor / Research Promotion Manager, Ayato Sato

分担研究 (日本語) 阻害物質の阻害様式の物理化学的解析  
開発課題名：(英語) Physicochemical analyses on the mode of inhibition of inhibitors

研究開発分担者 (日本語) 金城学院大学 薬学部、教授、黒崎博雅

所属 役職 氏名 : (英語) Kinjo Gakuin University Faculty of Pharmacy, Professor,  
Hiromasa Kurosaki

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 1. 新規ドラッグターゲット候補分子の精製と構造および機能解析

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM) の佐藤綾人特任准教授の管理する化学物質ライブラリーを対象にして、カルバペネマーゼ阻害活性を有する物質を探索した結果、数種類の阻害物質の候補物質を得た。その中からもっとも強い阻害活性を有する物質を選び、酵素化学的な解析を試み、また、カルバペネマーゼと阻害物質との共結晶の作成を試みた。その結果、この阻害物質は、精製した酵素とカルバペネマーゼ産生菌の双方に対し、強い阻害活性を示すことが確認され、阻害物質の濃度が数  $\mu\text{g/ml}$  で、カルバペネムの MIC が数管以上低下させる現象が確認された。また、この阻害物質と主要な複数のカルバペネマーゼとの共結晶の作成に成功したことから、阻害様式の解析を進めつつある。

また、病原菌の生育に不可欠な分子で新規のドラッグターゲットになりうる分子を複数選択することができ、そのうちのいくつかについて、精製に成功し、また、その分子の阻害を測定するアッセイ系の構築に成功した。

### 2. ケミカルスクリーニングによる多剤耐性菌に有効な新規阻害物質の探索

平成 27 年度に荒川グループから研究者を受け入れ、分担者のラボにおいてスクリーニング系の確立後、ITbM が保有する化合物ライブラリー（約 25,000 化合物）の中からカルバペネマーゼを阻害する物質をスクリーニングした。特に 1 種類の化合物 A は、カルバペネマーゼを強力に阻害する一方、その阻害活性モードは既知化合物とは構造的に大きく異なっていると考えられた。

平成 28 年度は、別種のカルバペネマーゼに対し化合物スクリーニングを継続しつつ、カルバペネムに耐性を獲得した多剤耐性菌モデルに著効を示す化合物 A の構造活性相関研究を荒川グループとともに実施した。佐藤のグループは市販されていない化合物を中心に構造展開を実施し、その中で強力なカルバペネマーゼ阻害活性を有する化合物 B を見出す事に成功した。またドッキングシミュレーションの結果から、化合物 A および化合物 B の官能基のサイズ、電荷、脂溶性などについて重要な情報を得る事に成功している。化合物を合成することによる構造活性相関研究とその結果から得られたリード化合物についての知見・成果（リードジェネレーション、リード最適化）がえられたことは本研究が当初の計画を先取りして進んでいることを意味している。

### 3. 阻害物質の阻害様式の物理化学的解析

荒川らのグループはカルバペネマーゼを数  $\mu\text{M}$  から数十  $\mu\text{M}$  の濃度で阻害する物質を数種類ほど見出しているが、黒崎らはこのうちの 1 つの阻害物質とカルバペネマーゼとの共結晶の作成に成功し、X 線回折データを収集することができた。これと並行して、上述の阻害物質の細菌への膜透過性の向上を図るために、阻害物質とセファロsporin 中間体とを結合させた化合物（セファロsporin 誘導体と略す）を 5 種類ほど分子設計し化学合成を行った。予備実験として合成化合物の 1 つを用いて精製したカルバペネマーゼに対する阻害活性を調べたところ、阻害効果が認められた。

以上の結果から、予定していたセファロsporin 誘導体の合成もほぼ終了していることと、収集した X 線回折データの精密化が進行中である。

## 1. Purification of new drug-target molecules and characterization of their structure and function

Several candidates for carbapenemase inhibitors were obtained by screening of the chemical

library maintained by Dr. Sato, ITbM. Among them, one compound showing strongest inhibitory effect against carbapenemases was selected and characterized molecularly using purified carbapenemase and live bacteria possessing MDR nature. In the presence of the inhibitor (10 ml/L), carbapenem MICs were reduced for more than several tubes. We also succeeded in getting co-crystals of inhibitor and several carbapenemases, and have started molecular characterization of inhibitory mode of the inhibitor against carbapenemases.

Together with above described results, we succeeded in getting several molecules which are essential for bacterial growth. Since we got some purified molecules, we also succeeded in establishing assay methods for detecting inhibitory effects of the inhibitor.

## **2. Chemical screening of novel small molecules that exhibit inhibitory activities against multi-drug resistant bacteria**

In FY 2015, my group has been established a high-throughput screening system, promoted chemical screening of a unique collection of 25000 compounds in ITbM, and succeeded in identifying novel inhibitors of one of  $\beta$ -lactamases, carbapenemase through a collaboration with Prof. Arakawa's group. As a result, we succeeded in identifying several structural diverse hit compounds having an inhibitory activity of the enzyme. One of the hit compounds, named compound A, exhibited potent inhibitory activity of the enzyme and its mode of action was expected to be markedly different from several reported compounds to date.

FY 2016, structure-activity relationship study of the compounds A was initiated while chemical screening of small molecules that inhibit the other carbapenemases with extensive collaboration with Prof. Arakawa's group. My group conducted in synthesizing commercially unavailable compounds of compound A's derivatives in the SAR study and we finally succeeded in identifying a potent compound B having comparable activity to compound A. Computational studies on these compounds suggested us important information to design, a size of side chains, an electric charge and lipophilicity of the compound, and so on. These results in this fiscal year, the SAR study of compound A with synthesized molecules and a result of computational studies for lead generation process, were suggested to make a progress successfully more than originally planned.

## **3. Physicochemical analyses on the mode of inhibition of inhibitors**

Arakawa's group found several inhibitors for carbapenemases in a concentration range of several tens of  $\mu\text{M}$  to several  $\mu\text{M}$ . Dr. Kurosaki has succeeded in preparing co-crystals of carbapenemase with one of these inhibitors and collecting X-ray diffraction data. In parallel with this, in order to improve the membrane permeability of the above-mentioned inhibitor to bacteria, we designed and synthesized novel five compounds bound it to a cephalosporin intermediate. As a preliminary experiment, the inhibitory activity against purified carbapenemase with one of synthetic compounds was investigated and inhibitory effect was confirmed.

Based on these results, synthesis of the cephalosporin derivatives planned was nearly completed, and refinement of the collected X-ray diffraction data is ongoing.

### Ⅲ. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）  
該当するものなし
  
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
該当するものなし
  
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
特記すべきものなし
  
- (4) 特許出願  
特記すべきものなし