

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04496

研究課題名(和文)糖鎖を標的分子とした抗菌薬リードの創製

研究課題名(英文)Development of drug leads targeting fungal glycans

研究代表者

中川 優(Nakagawa, Yu)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：90452284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、X線結晶構造解析および固体NMR解析により、Pradimicin A (PRM-A) のマンノース(Man)認識機構を解明するとともに、合成オリゴマンノースを用いた結合試験により、PRM-Aが真菌マンナンの非還元末端Man残基が密集している箇所を選択的に結合することを見出した。さらにこれらの知見に基づいて誘導体設計を行い、凝集性を抑えたPRM-Amideおよび真菌マンナンを蛍光染色するPRM-Azideを開発した。

研究成果の概要(英文)：This study uncovered the molecular basis of D-mannose (Man) recognition of Pradimicin A (PRM-A) by a combination of X-ray crystallography and solid-state NMR spectroscopy. It is also suggested by binding studies using synthetic oligomannoses that PRM-A could recognize regions in fungal mannans where Man residues at the non-reducing ends are densely located. Based on these findings, we developed two derivatives of PRM-A, PRM-Amide with a less aggregative property and PRM-Azide capable of fluorescently staining fungal mannans.

研究分野：天然物化学

キーワード：抗生物質 糖鎖 pradimicin 分子認識

## 1. 研究開始当初の背景

近年、抗菌薬に対する耐性菌の出現が医療機関における重大な脅威となっている。現存する抗菌薬が効かない「悪夢の耐性菌」カルバペネム耐性腸内細菌をはじめ、様々な多剤耐性菌が急激に増加しており、病原微生物の薬剤耐性に対する対策が世界的規模で展開されつつある。2011年に世界保健機構は「No Action Today, No Cure Tomorrow」のメッセージとともに耐性菌の拡大を食い止める対策を提唱している。また、日本学術会議も2013年のG8サミットにおいて「病原微生物の薬剤耐性問題：人類への脅威」という共同声明を発表している。日本国内においても、2014年に医学・薬学系の6学会が新規抗菌薬開発の重要性に関する提言書を厚労省、文科省、経産省の3大臣に提出している。病原微生物の薬剤耐性がここ数年間で特に問題視されるようになった主な理由としては、多くの製薬企業が利益の少ない抗菌薬開発から撤退していること、また大学や研究機関においても抗菌薬の新たな標的となりうる分子の探索研究が停滞していることが挙げられる。

現在承認されている抗菌薬の大部分は「核酸あるいはタンパク質」を標的分子としているが、1988年に放線菌から単離された Pradimicin A (PRM-A, Fig. 1) は、真菌類の細胞壁に存在するマンナン [D-マンノース (Man) を主成分とする多糖] に結合して抗真菌活性を示す類稀な低分子化合物である [1]。PRM-A は「糖鎖」を直接の標的分子とする前例のない抗菌薬リードとして期待を集めたが、極めて高い凝集性を有するためにその糖認識機構および抗菌メカニズムの解析研究は十分に進展せず、PRM-A をリードとした抗菌薬開発は中断を余儀なくされていた。

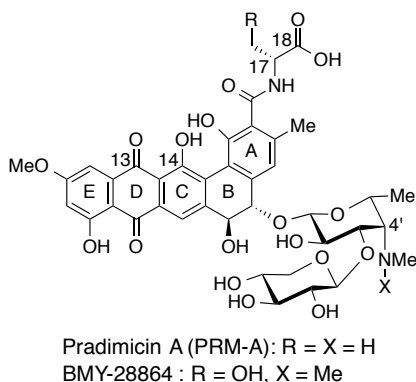


Fig. 1 PRM-A および BMY-28864

このような状況の中、本研究代表者らは近年、PRM-A の糖鎖結合における最小認識単位である Man と PRM-A との複合体を凝集体として調製し、固体 NMR でその複合体構造を解析するという全く新しい解析戦略を実践した [2-4]。その結果、複合体中における PRM-A と Man の原子間距離を網羅的に取得することに成功し、PRM-A による糖認識機構を解明するための突破口を見いだすに至っている。

## 2. 研究の目的

PRM-A に基づいて抗菌薬リードを合理的に設計するためには、Man 認識機構を明らかにするとともに、真菌における標的分子であるマンナンとの結合解析が必要不可欠である。そこで本研究では、(1) PRM-A と Man の結合様式を解明するとともに、(2) マンナンの構造上の特徴を有するマンノオリゴ糖を系統的に化学合成し、PRM-A が高い結合親和性を示すマンナン部分構造を特定することを目的とした。さらに、これらの知見をもとに、(3) 合成が容易で、かつ凝集性を示さない PRM-A アナログを新たな抗菌薬リードとして設計開発することを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) PRM-A と Man の結合様式の解析

PRM-A と Man の結合様式を解明するためには、PRM-A の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位を特定する必要がある。そこで、PRM-A の水溶性アナログである BMY-29964 (Fig. 1) の  $\text{Ca}^{2+}$  複合体の結晶を作成し、X線構造解析によって  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位を特定するとともに、これまでの固体 NMR 解析から得られた原子間距離情報をもとに密度汎関数法 (DFT) 計算によって PRM-A と Man の結合様式の解析を行なった。

### (2) マンノオリゴ糖との結合解析

*Candida* 属などの真菌の細胞壁マンナンは、Man が  $\alpha$ -1,6 結合で連結した主鎖に  $\alpha$ -1,2 結合あるいは  $\alpha$ -1,3 結合で連結したマンノオリゴ糖が側鎖として付加した櫛型構造を基本骨格としている。また、側鎖の末端には、 $\beta$ -1,2 結合で連結したマンノオリゴ糖が一部付加されており、このオリゴ糖部分がコンパクトに折り畳まれたヘリ

ックス様構造を形成していることも特徴として挙げられる [5]. さらに、側鎖の一部にはリン酸基を介して Man が結合しているモチーフも存在する. そこで、これらの構造上の特徴を有するマンノオリゴ糖 (Fig. 2) を有機合成し、PRM-A との結合試験を行った.

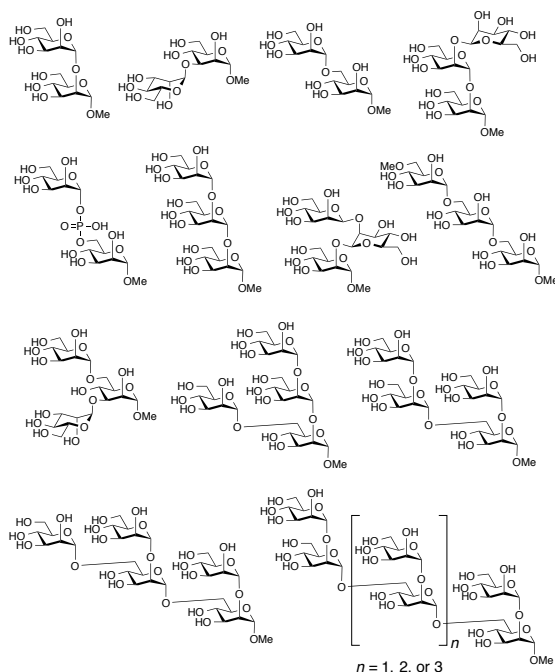


Fig. 2 合成したマンノオリゴ糖

### (3) PRM-A アナログの開発

創薬リードとしての PRM-A の大きな欠点の一つは、高い凝集性である. そこで、(1) で得られた情報をもとに、Man 結合特異性を保持し、かつ凝集性を低めたアナログの設計を行った.

## 4. 研究成果

### (1) PRM-A と Man の結合様式の解析

BYM-28864 の  $\text{Ca}^{2+}$  複合体の結晶は、 $\text{CaCl}_2$  を含む MOPS バッファー (pH 7.0) 中で作成した. X 線構造解析の結果、二分子の BYM-28864 が 13 位カルボニル基および 14 位水酸基部分で  $\text{Ca}^{2+}$  と結合した二量体構造を形成していることが明らかになった (Fig. 3; A). さらに、二次元固体 NMR 解析によって、Man と結合した状態においても PRM-A は結晶構造に対応する二量体を形成していることが確認された. そこで、本結晶構造とこれまでの固体 NMR 解析から得られた知見を基に、DFT 計算によって PRM-A,  $\text{Ca}^{2+}$ , および methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside (Man-OME)

の複合体モデルを構築したところ、PRM-A は Man-OME の 2, 3, 4 位水酸基と水素結合を形成する一方で、6 位水酸基とは相互作用しないことが示唆された (Fig. 3; B). 本結合様式は、PRM-A が 2-, 3-, あるいは 4-deoxy-Man-OME と結合しないのに対し、6-deoxy-Man-OME とは結合するという知見と完全に一致することから、本モデルが妥当であることが確認された.

本研究は、「低分子化合物による Man 認識」という類稀な現象を分子レベルで解明した初めての例であり、天然物化学, 創薬化学, 糖鎖科学における学術的意義は極めて大きい.

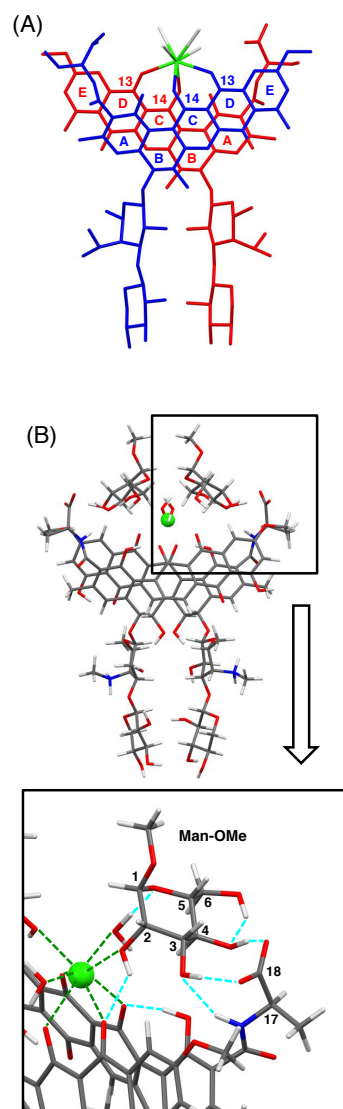


Fig. 3 (A) BYM-28864 の  $\text{Ca}^{2+}$  複合体の結晶構造 (赤および青: BYM-28864, 緑:  $\text{Ca}^{2+}$ ). (B) PRM-A/ $\text{Ca}^{2+}$ /Man-OME 複合体モデル (灰: C, 赤: O, 青: N, 白: H, 緑:  $\text{Ca}^{2+}$ ).

## (2) マンノオリゴ糖との結合解析

PRM-A は真菌の細胞壁マンナンに結合することにより抗真菌活性を示す。従って、マンノオリゴ糖共存下で抗真菌試験を行った場合、PRM-A は真菌の細胞壁マンナンだけでなくオリゴ糖とも結合することになり、オリゴ糖との結合活性に応じて PRM-A の抗真菌作用が阻害される。そこで、*Candida rugosa* に対する PRM-A (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の抗真菌作用を阻害するマンノオリゴ糖の最小濃度を求めることにより、合成したマンノオリゴ糖 (Fig. 2) と PRM-A の結合を評価した。その結果、PRM-A は非還元末端を一つ有するオリゴ糖よりも複数有するオリゴ糖に強く結合し、その結合活性は非還元末端の数が高くなるほど高くなることが明らかとなった。本結果より、PRM-A は真菌マンナンの非還元末端 Man 残基が密集した部分に選択的に結合することが示唆された。

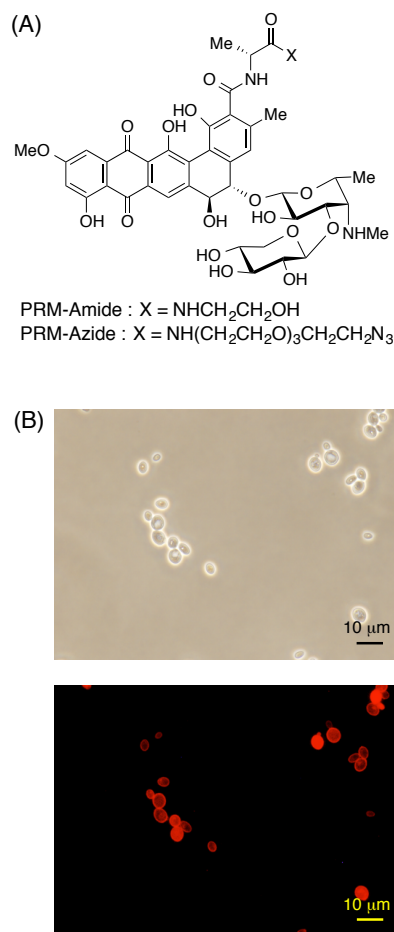
本研究で得られた知見は、PRM-A の抗真菌メカニズムを解明する上で基盤となるものであり、PRM-A に基づく抗真菌薬開発に貢献することが期待される。

## (3) PRM-A アナログの開発

PRM-A/ $\text{Ca}^{2+}$ /Man 複合体モデルに基づくと、PRM-A のカルボキシ基をアミド化しても Man の 2, 3, 4 位水酸基と水素結合を形成できる可能性が示唆された。そこで、PRM-A と 2-aminoethanol を縮合したアナログ PRM-Amide (Fig. 4; A) を合成し、その Man 結合活性を等温滴定カロリメトリー (ITC) で評価した。その結果、結合活性は PRM-A よりも 5 倍程度低いものの、PRM-Amide は Man と特異的に結合することが確認された。さらに、PRM-Amide は凝集性が極めて低いうえ、*C. rugosa* に対して顕著な抗真菌活性 (MIC = 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示すことが明らかになった。本結果は、PRM-Amide が PRM-A よりも優れた創薬リードであることを示唆するものであり、PRM-A に基づく創薬研究再開の突破口となりうるものである。

さらに本結果に基づき、PRM-A を利用した糖鎖染色剤の開発も試みた。PRM-A のカルボキシ基にアミド結合を介して 11-azido-3,6,9-trioxoundecan-1-amine を導入した PRM-Azide (Fig. 4; A) を合成したところ、本誘導体は PRM-Amide と同程度の活性で

Man と結合し、他の主要な単糖には全く結合しないことが明らかとなった。そこで、PRM-Azide と蛍光基 TAMRA-alkyne を用いたアジド-アルキン付加環化反応 (CuAAC) により *C. rugosa* の細胞壁マンナンの蛍光染色を試みたところ、細胞表面に顕著な蛍光が観察できた (Fig. 4; B)。本結果は、PRM-Azide が糖鎖を蛍光染色するツール分子として糖鎖生物学研究に利用できる可能性を示唆するものである。



**Fig. 4** (A) PRM-Amide および PRM-Azide. (B) PRM-Azide と TAMRA-alkyne の CuAAC 反応を利用した *C. rugosa* の蛍光染色 (上: 位相差画像, 下: 蛍光画像).

## (4) がん細胞に対して毒性を示す Quinocidin の単離

放線菌 *Actinomadura* sp. TP-A0019 から PRM-A を単離する過程で、ヒト子宮頸癌由来 HeLa-S3 細胞に対して毒性 (IC<sub>50</sub> = 0.63  $\mu\text{M}$ ) を示す新規天然物 Quinocidin (Fig. 5) を単離同定した。Quinocidin は天然では極めて稀は 3,4-dihydroquinolizinium 骨格を

有しており、中性水溶液中、室温でチオールと選択的に付加反応を起こすことが明らかになった。これまで3,4-Dihydroquinolizinium環を母核とする天然物の報告はなく、また本へテロ環へのチオールの付加反応も知られていなかったことから、quinocidin は新たな抗がん剤リードになるとともに、ケミカルバイオロジー研究への応用も期待できる。

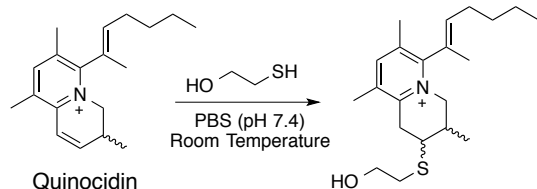


Fig. 5 Quinocidin とチオールの付加反応

#### <引用文献>

[1] Oki, T. *et al. J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1701. [2] Nakagawa, Y. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6084. [3] Nakagawa, Y. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17485. [4] Nakagawa, Y. *et al. Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 10516. [5] Shibata, N. *et al. Biochem. J.* **2007**, *404*, 365.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Nakagawa, Y.; Sawaki, Y.; Kimura, T.; Tomura, T.; Igarashi, Y.; Ojika, M. Quinocidin, a cytotoxic antibiotic with an unusual 3,4-dihydroquinolizinium ring and Michael acceptor reactivity toward thiols, *Chem. Eur. J.* (2017) **23**, 17894-17897 (査読有). DOI: 10.1002/chem.201704729
  - ② Doi, T.; Nakagawa, Y.; Takegoshi, K. Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Analysis Reveals a Possible Calcium Binding Site of Pradimicin A, *Biochemistry* (2017) **56**, 468-472 (査読有). DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01300
  - ③ Staveness, D.; Abdelnabi, R.; Near, K. E.; Nakagawa, Y.; Neyts, J.; Delang, L.; Leyssen, P.; Wender, P. A. Inhibition of Chikungunya Virus-Induced Cell Death by Salicylate-Derived Bryostatins Provides Additional Evidence for a PKC-Independent Pathway, *J. Nat. Prod.* (2016) **79**, 680-684 (査読有). DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01017
  - ④ Nakagawa, Y.; Watanabe, Y.; Igarashi, Y.; Ito, Y.; Ojika, M. Pradimicin A, a D-mannose-binding antibiotic, binds pyranosides of L-fucose and L-galactose in a calcium-sensitive manner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2015) **25**, 2963-2966 (査読有). DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.05.021
  - ⑤ 中川 優, 天然物の構造単純化による有用分子の創製: 天然プロテインキナーゼ C 活性化剤のアナログ設計, *有機合成化学協会誌* (2015), **73**, 316-327 (査読有). DOI: 10.5059/yukigoseikyokaishi.73.316
- [学会発表] (計29件)
- ① 澤木裕紀, 中川 優, 小鹿 一: Quinocidin のアナログ合成と細胞毒性評価. 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋), 2018.
  - ② 渡邊泰典, 中川 優, 山地史哉, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 小鹿 一: プラディミシンと高マンノース型糖鎖のオリゴ糖モチーフとの結合解析. 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋), 2018.
  - ③ 中川 優: 天然物研究における微生物の利用法. 第 5 回糸状菌分子生物学若手の会 (佐賀), 2017.
  - ④ 澤木裕紀, 中川 優, 木村高啓, 戸村友彦, 小鹿 一: チオール捕捉能を有する細胞毒性物質 Quinocidin の単離と合成. 第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム (名古屋), 2017.
  - ⑤ 都築麗江, 中川 優, 戸村友彦, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 小鹿 一: 抗生物質プラディミシンを用いた真菌マンナンの蛍光染色. 第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム (名古屋), 2017.
  - ⑥ 澤木裕紀, 中川 優, 戸村友彦, 小鹿 一: Quinocidin の母核化合物に対する求核剤の付加反応解析. 日本農芸化学会中部支部第 180 回例会 (名古屋), 2017.
  - ⑦ 山地史哉, 中川 優, 渡邊泰典, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 小鹿 一: プラディミシンと真菌マンナンの分岐型オリゴ糖モチーフとの結合解析. 日本農芸化学会中部支部第 180 回例会 (名古屋), 2017.
  - ⑧ 渡邊泰典, 中川 優, 山地史哉, 伊藤幸成, 五十嵐康弘, 小鹿 一: プラディミシンと高マンノース型糖鎖の分岐型オリゴ糖モチーフとの結合解析. 日本農芸化学会中部支部第 180 回例会 (名古屋), 2017.
  - ⑨ 山地史哉, 中川 優, 渡邊泰典, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 小鹿 一: プラディミシンは真菌マンナンの分岐型マンノオリゴ糖部分に選択的に結合する. 第 36 回日本糖質学会年会 (旭川), 2017.
  - ⑩ 中川 優, 都築麗江, 戸村友彦, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 小鹿 一: 天然低分子化合物を利用した真菌マンナンの蛍光染色. 第 36 回日本糖質学会年会 (旭川), 2017.
  - ⑪ 澤木裕紀, 中川 優, 木村高啓, 戸村友彦, 小鹿 一: 3,4-Dihydroquinolizinium

- 環を有する新規天然物の単離，合成および生物活性評価。第 111 回有機合成シンポジウム（岡山），2017.
- ⑫ 宮西 航，中川 優，小鹿 一：糖鎖結合性天然物の探索に向けたオリゴ糖固定磁気ビーズの合成と評価。日本農芸化学会 2017 年度大会（京都），2017.
- ⑬ 澤木裕紀，中川 優，木村高啓，戸村友彦，小鹿 一：3,4-Dihydroquinolizinium 環を有する新規天然物の単離，構造決定および生物活性評価。日本農芸化学会 2017 年度大会（京都），2017.
- ⑭ 山地史哉，中川 優，渡邊泰典，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：真菌マンナンのオリゴ糖モチーフに対するプラディミシンの結合活性。日本農芸化学会 2017 年度大会（京都），2017.
- ⑮ 都築麗江，中川 優，戸村友彦，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：糖鎖を蛍光染色するプラディミシン誘導体の開発。日本農芸化学会 2017 年度大会（京都），2017.
- ⑯ 渡邊泰典，中川 優，山地史哉，土井崇嗣，竹腰清乃理，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：プラディミシン A とマンノトリオースとの結合様式の解析。日本農芸化学会 2017 年度大会（京都），2017.
- ⑰ 中川 優：マンノース結合性天然物の糖認識機構解析：糖鎖研究への利用を目指して。理研シンポジウム（埼玉），2017.
- ⑱ 山地史哉，中川 優，渡邊泰典，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：プラディミシンと真菌マンナンのオリゴ糖モチーフとの結合解析。日本農芸化学会中部支部第 177 回例会（名古屋），2016.
- ⑲ 都築麗江，中川 優，戸村友彦，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：プラディミシン A を利用した糖鎖の蛍光染色。日本農芸化学会中部支部第 177 回例会（名古屋），2016.
- ⑳ 渡邊泰典，中川 優，土井崇嗣，竹腰清乃理，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：プラディミシン A と分岐型マンノトリオースとの結合解析。日本農芸化学会中部支部第 177 回例会（名古屋），2016.
- ㉑ 山地史哉，中川 優，渡邊泰典，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：プラディミシンと真菌の細胞壁マンナンとの結合解析。第 35 回日本糖質学会年会（高知），2016.
- ㉒ 都築麗江，中川 優，戸村友彦，土井崇嗣，竹腰清乃理，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：糖鎖生物学用ツール分子の開発に向けたプラディミシン A の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位の同定。第 35 回日本糖質学会年会（高知），2016.
- ㉓ 渡邊泰典，中川 優，伊藤幸成，土井崇嗣，竹腰清乃理，五十嵐康弘，小鹿 一：固体 NMR によるプラディミシンとマンノトリオースとの相互作用解析。第 35 回日本糖質学会年会（高知），2016.
- ㉔ 山地史哉，中川 優，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：プラディミシンと *Candida* 属真菌の細胞壁マンナンとの結合解析。日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌），2016.
- ㉕ 都築麗江，中川 優，戸村友彦，土井崇嗣，竹腰清乃理，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：プラディミシン A はアントラキノン部分でカルシウムと結合する。日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌），2016.
- ㉖ 渡邊泰典，中川 優，都築麗江，菅原貴弘，相田美砂子，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：プラディミシン A との結合におけるマンノースの環内酸素原子の寄与。日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌），2016.
- ㉗ 中川 優：プラディミシンはいかに糖を認識しているか？ 第 3 回天然物化学研究会（東京），2015.
- ㉘ 渡邊泰典，中川 優，五十嵐康弘，伊藤幸成，小鹿 一：プラディミシン A はマンノースの環内酸素原子を認識する。2015 年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会（富山），2015.
- ㉙ 渡邊泰典，中川 優，伊藤幸成，五十嵐康弘，小鹿 一：マンノース結合性抗生物質プラディミシン A の糖結合解析。第 34 回日本糖質学会年会（東京），2015.

〔図書〕（計 1 件）

- ① Nakagawa, Y.; Ito, Y. Solid-state NMR Analysis of Mannose Recognition by Pradimicin A. In *NMR in Glycoscience and Glycotechnology*; Kato, K., Peters T., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2017; pp 269-289.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 優 (NAKAGAWA, Yu)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授  
研究者番号：90452284

(2) 研究分担者

竹腰 清乃理 (TAKEGOSHI, Kiyonori)  
京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：10206964  
相田 美砂子 (AIDA, Misako)  
広島大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：90175159

(3) 連携研究者

小鹿 一 (OJIKAWA, Makoto)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：50152492