

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15421

研究課題名(和文) 中・大型複雑構造ペプチド天然物の大規模構造活性相関による新規生物活性分子創出

研究課題名(英文) Comprehensive structure-activity relationship study of large and complex peptidic natural products

研究代表者

伊藤 寛晃 (Itoh, Hiroaki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：20758205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中・大型複雑構造ペプチド天然物と、その類縁体が構成する化学空間を対象として機能解析研究を実施した。

WAP-8294A2については、新たに確立した固相全合成を基盤とした機能解析により、本分子がメナキノン依存的膜破壊活性を示すことを明らかにした。また、蛍光標識ポリセオナミドBの合成と、これに基づく作用解析の結果、本分子が細胞膜電位変化を引き起こすことに加え、リソソーム-細胞質間のpH勾配を解消する複合的な作用を持つことを強く示唆する結果を得た。さらに、ヤクアミドBの末端構造改変類縁体群の合成とこれらを用いた解析により、本分子がFoF1-ATP合成酵素に結合することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、顕著な抗菌活性、抗がん活性などの極めて重要な生物活性を示す中・大型複雑構造ペプチド天然物に該当する複数の化合物および類縁体の合成的供給法を確立した。ここで見出された方法論は、他の中・大型複雑構造ペプチドの合成にも直接的に応用可能であり、これら化合物群の持つ機能解析ならびに類縁体合成へ資することが期待される。また、これら化合物の持つ分子機能ならびに特異な作用機構を明らかにしたことで、中・大型複雑構造ペプチドの構成する化学空間の潜在的有用性を示した。以上より、本成果は将来的に有用な新規医薬品シーズの発見へも寄与しうる、薬学、有機化学を含む広範な領域に対して意義を有するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, solid-phase total synthesis of a peptide antibiotic WAP-8294A2 was achieved. Further functional evaluation revealed the antimicrobial activity of WAP-8294A2 is due to their membrane-disrupting effects depend on the presence of menaquinone. We also achieved solid-phase total synthesis of a channel-forming peptide polytheonamide B, which enabled the investigation of the mechanism of action. The addition of polytheonamide B to MCF-7 cells rapidly diminished a potential across the plasma membrane. Furthermore, polytheonamide B was found to be internalized into the cells, accumulating in lysosomes and neutralizing the lysosomal pH gradient. In addition, the cellular target of yaku' amide B was elucidated. Pull-down assays with biotinylated probes revealed FoF1-ATP synthase as the major target protein of yaku' amide B.

研究分野：有機化学、生物有機化学

キーワード：有機化学 構造活性相関 固相合成 ペプチド ケミカルバイオロジー 生物機能分子 天然物 全合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中・大型複雑構造ペプチド系天然物には、重要かつ強力な生物活性を示すものの、天然資源の希少性ならびに合成的供給の困難さなどから探索が不十分な化合物が多く存在する。したがって、これら中・大型複雑構造ペプチド天然物と、その類縁体が構成する化合物群を対象とした機能解析研究は、新たな創薬シーズの創出に資する可能性が高く、極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、中・大型複雑構造ペプチドの基盤構造として、重要かつ顕著な生物活性を示す天然物を選択し、これらの類縁体が構成する化学空間に該当する化合物群を合成し、機能解析研究を実施する。これにより、各天然物の持つ機能を明らかにすること、また有用な天然物類縁体を創出することを目指す。

3. 研究の方法

対象とするペプチド系天然物(WAP-8294A2, ポリセオナミド B およびヤクアミド B)の全合成を基盤とした類縁体合成と、これらの類縁体を用いた詳細な機能解析研究により、各天然物の持つ機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) WAP-8294A2および類縁体の固相全合成と機能評価

WAP-8294A2 (**1**, 図1)は、*Lysobacter*属細菌の培養上清から単離・構造決定された環状デブシペプチド天然物であり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対して顕著な抗菌活性を示す。また、**1**と類似の構造を有する天然物ライソシンE (**3**)は、黄色ブドウ球菌の細胞膜に存在し、電子伝達系に必須の補酵素であるメナキノン(MK)を標的とし、細菌細胞膜破壊活性を有すること、また、ヒトの電子伝達系で用いられるユビキノン(UQ)とは相互作用しないことが知られている。一方で、**1**の作用機構に関しては、これまで詳細は不明であった。本研究では、**1**およびデオキシ類縁体**2**の固相全合成法を確立し、これらの生物活性を詳細に評価することで作用機構を解明することを目的とした。

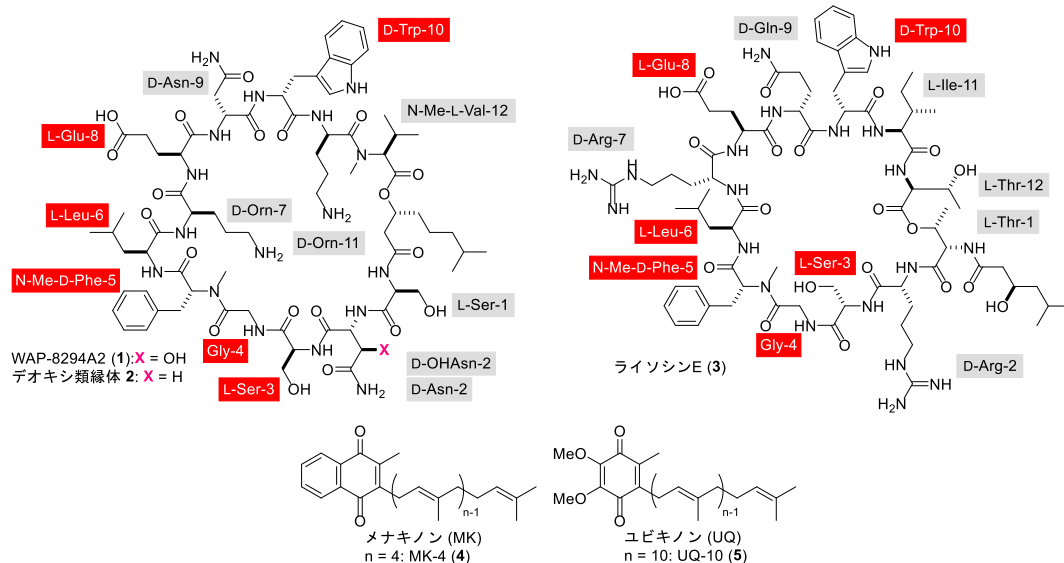


図1 WAP-8294A2 (**1**)、デオキシ類縁体(**2**)、ライソシンE (**3**)、MK-4 (**4**)およびUQ-10 (**5**)の構造式

1の固相全合成に関しては、固相担体としてWang-ChemMatrix樹脂を採用した。グルタミン酸アリルエステルを担持した樹脂**6**を出発物質として、Fmoc基の除去と、HATU、HOAtを用いたアミノ酸ユニットの縮合反応を繰り返すことでペプチド鎖を伸長した。続いて、C末端のアリルエステルのPd(PPh₃)₄による化学選択的除去、PyBOPによるマクロラクタム化、TBAFおよび酢酸ならびにTFA/H₂Oによる段階的な脱保護により、27工程8.4%の総収率で**1**を得ることに成功した(図2)。デオキシ類縁体**2**についても同様の方法にて得た。

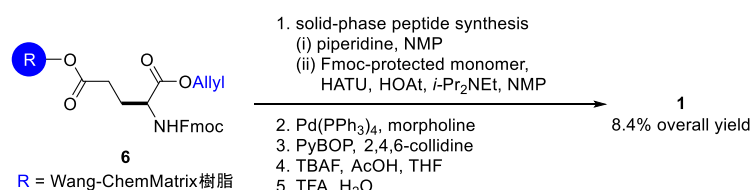


図2 **1**の固相全合成

1および2のMRSAに対する抗菌活性を評価したところ、両化合物は同等の最小発育阻止濃度(MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$)を示した。さらに、抗菌活性発現機構に関する知見を得るため、MK-4 (4)またはUQ-10 (5)を添加したリポソームを用いて膜破壊活性を評価した。結果として、1、2ともに、3と同様に4含有リポソームに対する選択的膜破壊活性が観測され、これらの化合物が4を含む脂質二重膜を認識して膜破壊活性を示すことで抗菌活性を示すことが強く示唆された。

本研究は、1がMKを認識して膜破壊活性を有することを初めて示したことに加え、1-3に内在するMK認識のための構造要件に関して極めて重要な示唆を与えるものであり、これらの知見を応用した新規抗菌化合物および新規機能分子創出への展開が期待される。本成果は*The Journal of Organic Chemistry*誌に報告した(発表論文6)。

(2) ポリセオナミドBの細胞内挙動解析

ポリセオナミドB (7, 図3)は、48アミノ酸残基からなる巨大ペプチド系天然物である。多数の非タンパク質構成アミノ酸を含むD-, L-アミノ酸が交互に配列する7の一次構造は、 $\beta^{6.3}$ -ヘリックスと呼ばれるらせん構造を形成し、脂質平面二重膜中で一価カチオン(H^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+)選択的なイオンチャネルとして機能する。また、7はP388マウス白血病細胞株に対し、極めて強力な毒性($\text{IC}_{50} = 0.098 \text{ nM}$)を示す。この細胞毒性は、7のイオンチャネル形成により細胞膜電位が乱れることに起因すると想定されていたが、7の哺乳動物細胞に対する作用機構の詳細は不明であった。本研究では、7の固相全合成法に基づく蛍光標識ポリセオナミドB (8)の効率的な供給により、7および8を用いた細胞内動的挙動および作用解析を実施した。

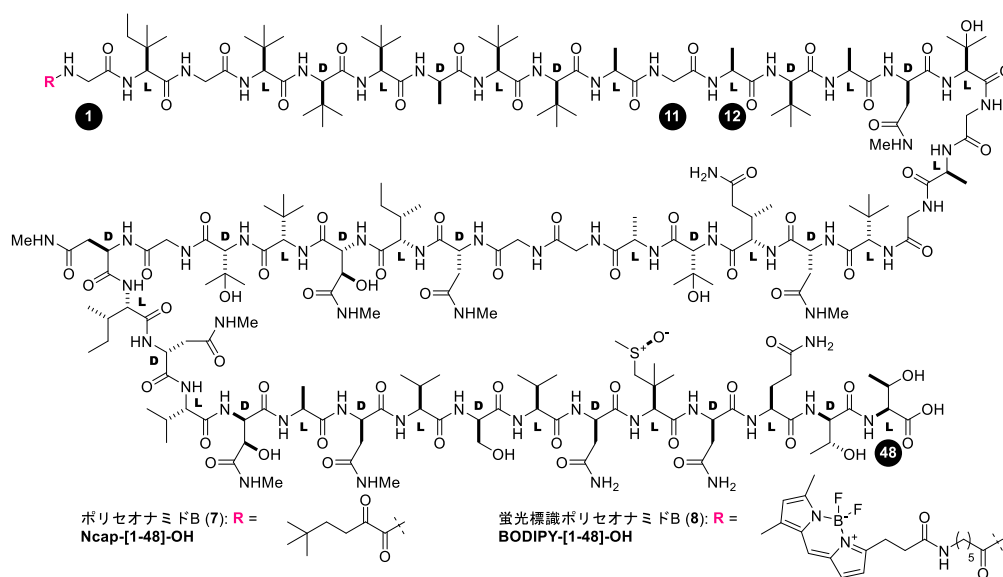


図3 ポリセオナミドB (7)および蛍光標識ポリセオナミドB (8)の構造式

蛍光標識体8の固相合成に際しては、7の固相全合成と同様に、側鎖間の相互作用や副反応を抑制する目的で、側鎖に1級アミド、2級アミドまたは3級ヒドロキシ基を有する非タンパク質構成アミノ酸ユニットに保護基を導入した。これらを用い、ChemMatrix樹脂担持スレオニン19を用いて、マイクロ波による加熱条件下固相合成を行うことで、37残基からなるC末端フラグメント20を固相上で構築した。別途固相合成で調製したN末端フラグメントとの縮合により21とした後、19個の保護基の除去と樹脂からのペプチド鎖の切断を経て、22を得た。これに、BODIPYタグ23を導入することで、8の全合成を1.9%の総収率で達成した(図4)。

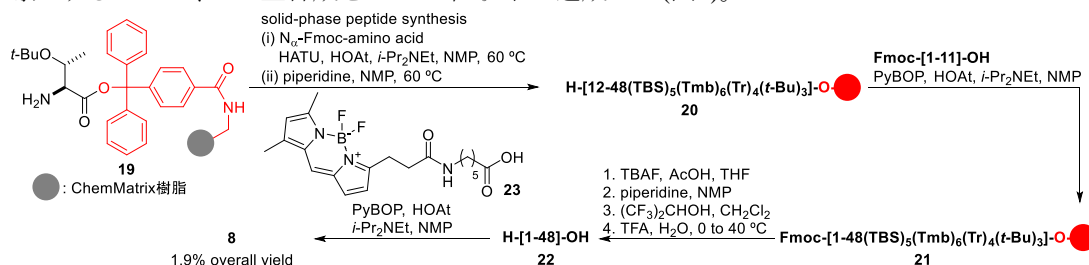


図4 8の全合成

7のイオンチャネル活性が細胞膜電位に及ぼす影響を評価したところ、7の Na^+ 輸送に起因する脱分極が起きることが示唆された。さらに、蛍光標識体8のMCF-7細胞内局在を、オルガネラ蛍光染色試薬を用いて調査した。その結果、8の緑色蛍光(図5)は、リソソーム蛍光標識色素LysoTrackerの赤色蛍光と良く一致した。また、リソソームのpH測定により、7のプロトン輸送に起因するリソソームpHの上昇が示唆された。さらに、フローサイトメトリーおよびミトコンドリア膜電位感受性色素を用いた解析により、7によるアポトーシスの誘導が示唆された。

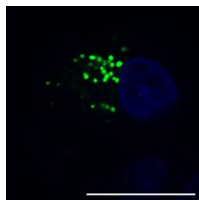


図5 8の細胞内局在

以上より、7が細胞膜電位の脱分極およびリソソーム-細胞質間のpH勾配解消という2つの作用を示し、これらの複合的な効果によりアポトーシスを誘導することを初めて明らかにした。本成果は*Journal of the American Chemical Society*誌に報告した(発表論文4)。

(3) ヤクアミドBの標的タンパク質同定

ヤクアミドB (24, 図6)は、屋久新首根産の希少深海海綿*Ceratopsion* sp.から単離された複雑構造ペプチド系天然物である。24はJFCR39ヒトがん細胞パネルに対して、既存の抗がん薬とは異なるパターンで強力な細胞増殖阻害活性を示す。本研究では、エナンチオマーを含む様々なケミカルプローブの合成と解析により、24の標的タンパク質を解析した。

24の細胞内局在に関する情報を得るため、N末端またはC末端に蛍光団BODIPYを導入した25および26を設計・合成した。また、標的タンパク質同定に向けて、リンカー長の異なるビオチン化プローブ27および28をそれぞれ用いた。さらに、生体内キラル分子の関与を直接的に評価するため、25のエナンチオマー(*ent*-25)も合成し、解析に付した。

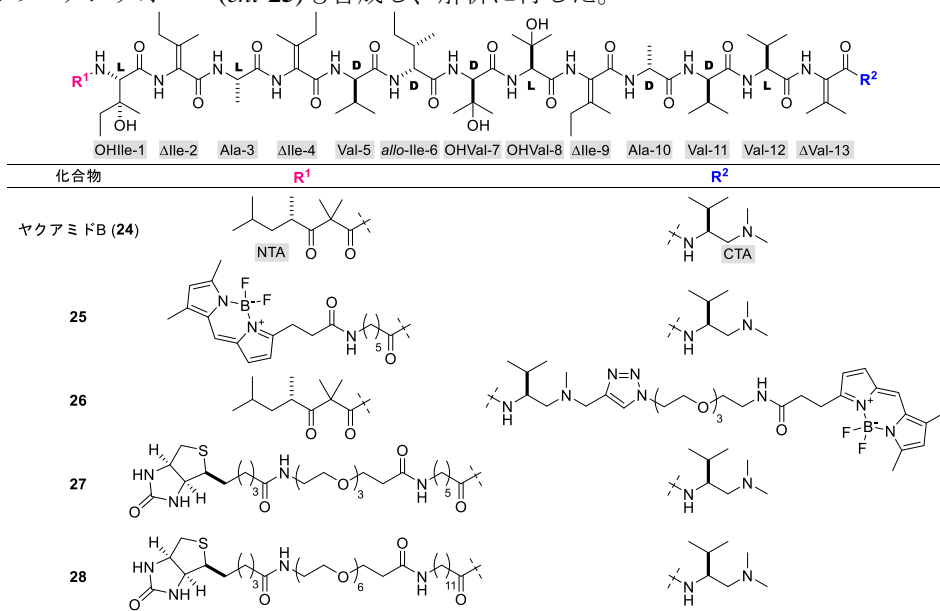


図6 ヤクアミドB (24)、蛍光標識体25および26、ビオチン化プローブ27および28の構造式

蛍光標識体(25, *ent*-25および26)のMCF-7細胞内における局在を調査したところ、25 (100 nM) および26 (20 nM)の緑色蛍光(図7a, b)は、ミトコンドリア蛍光染色試薬であるMitoTracker Red CMXRosの赤色蛍光と良く一致した。一方で、*ent*-25 (100 nM)は細胞内全体に分布した(図7c)ことから、24の細胞内標的はミトコンドリアに存在するキラル分子であることが示唆された。そこで、ビオチン化プローブを用いたアフィニティーブルダウンによる標的タンパク質精製を試みた。27および28とともに、対照化合物として29 (図7d)を用いて比較したところ、28選択的に50 kDa付近に2つのバンドが見出された(図7e)。これらのバンドは、ゲル内消化後のLC-MS/MS解析により、主にミトコンドリア内膜に存在するF₀F₁-ATP合成酵素のサブユニットαおよびβであることが明らかになった。続いて、24の標的タンパク質への作用を明らかにするため、ミトコンドリアにおけるATP産生作用と逆反応である加水分解に対する作用を評価したところ、24はF₀F₁-ATP合成酵素によるATP産生を阻害する一方で、逆反応であるATP加水分解を3倍程度亢進した。

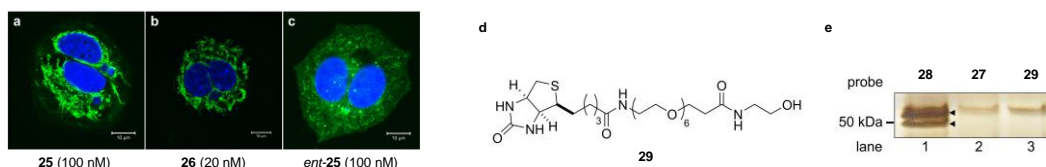


図7 (a-c)蛍光標識体の細胞内局在 (d)対照化合物29の構造式 (e)ビオチン化プローブを用いたアフィニティーブルダウン

今回明らかにした**24**のF₀F₁-ATP合成酵素に対する作用は、どちらも細胞内ATP濃度の低下に寄与し、**24**の標的タンパク質に対する機能が細胞増殖阻害機構と関連することを強く示唆する。本成果は*Journal of the American Chemical Society*誌に報告した(発表論文3)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, “Comprehensive Structure-Activity Relationship Studies of Macrocyclic Natural Products Enabled by Their Total Syntheses,” *Chemical Reviews*, in press. (査読有)
DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00063
- (2) Daisuke Urabe, Yuki Nakagawa, Ken Mukai, Kei-ichiro Fukushima, Naoto Aoki, Hiroaki Itoh, Masanori Nagatomo, Masayuki Inoue, “Total Synthesis and Biological Evaluation of 19-Hydroxysarmentogenin-3-*O*- α -L-rhamnoside, Trewianin, and Their Aglycons,” *The Journal of Organic Chemistry*, **2018**, 83, 13888–13910. (査読有)
DOI: 10.1021/acs.joc.8b02219
- (3) Kai Kitamura, Hiroaki Itoh, Kaori Sakurai, Shingo Dan, Masayuki Inoue, “Target Identification of Yaku’amide B and Its Two Distinct Activities against Mitochondrial F₀F₁-ATP Synthase,” *Journal of the American Chemical Society*, **2018**, 140, 12189–12199. (査読有)
DOI: 10.1021/jacs.8b07339
- (4) Atsushi Hayata, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, “Solid-Phase Total Synthesis and Dual Mechanism of Action of the Channel-Forming 48-mer Peptide Polytheonamide B,” *Journal of the American Chemical Society*, **2018**, 140, 10602–10611. (査読有)
DOI: 10.1021/jacs.8b06755
- (5) Yutaka Kofuku, Tomoki Yokomizo, Shunsuke Imai, Yutaro Shiraishi, Mei Natsume, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, Kunio Nakata, Shunsuke Igarashi, Hideyuki Yamaguchi, Toshimi Mizukoshi, Eiichiro Suzuki, Takumi Ueda, Ichio Shimada, “Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of β_2 -adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system,” *Journal of Biomolecular NMR*, **2018**, 71, 185–192. (査読有)
DOI: 10.1007/s10858-018-0174-5
- (6) Hiroaki Itoh, Kotaro Tokumoto, Takuya Kaji, Atmika Paudel, Suresh Panthee, Hiroshi Hamamoto, Kazuhisa Sekimizu, Masayuki Inoue, “Total Synthesis and Biological Mode of Action of WAP-8294A2: A Menaquinone-Targeting Antibiotic,” *The Journal of Organic Chemistry*, **2018**, 83, 6924–6935. (査読有)
DOI: 10.1021/acs.joc.7b02318

[学会発表] (計 21 件)

- (1) 三浦健介、伊藤寛晃、井上将行、フラグメント連結によるヤクアミド B の固相全合成、日本薬学会 第 139 年会、2019.3.20–23
- (2) 神谷光一、伊藤寛晃、井上将行、ヤクアミド B 類縁体の生物活性、日本薬学会 第 139 年会、2019.3.20–23
- (3) 薛贊唯、早田敦、伊藤寛晃、井上将行、ポリセオナミド模倣ペプチドの作用解析、日本薬学会 第 139 年会、2019.3.20–23
- (4) 徳本皓太郎、加治拓哉、伊藤寛晃、井上将行、ライソシン E を基盤とした OBOC ライブラリーの構築とスクリーニング、日本薬学会 第 139 年会、2019.3.20–23
- (5) Hiroaki Itoh, Target Identification of Anticancer Natural Product Yaku’amide B, The Third A3 Young Scientist Meeting (招待講演), 2019.2.22
- (6) 伊藤寛晃、ヤクアミド B の標的タンパク質同定、LiHub 創薬技術革新グループ ワークショップ 創薬関連研究の最先端(招待講演)、2019.2.16–17
- (7) Koichi Kamiya, Tomoya Yamashita, Kensuke Miura, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, Unified Total Synthesis of Yaku’amide B and Its Analogues, 10th International Peptide Symposium, 2018.12.3–7
- (8) Yuri Takada, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, Generation and Screening of Gramicidin A-Based Library, 10th International Peptide Symposium, 2018.12.3–7
- (9) 薛贊唯、早田敦、伊藤寛晃、井上将行、ポリセオナミド模倣ペプチドの作用解析、第 44 回反応と合成の進歩シンポジウム、2018.11.5–6
- (10) Hiroaki Itoh, Atsushi Hayata, Masayuki Inoue, Solid-Phase Total Synthesis and Biological Action of Polytheonamide B, The 13th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-13), 2018.11.1–4
- (11) 伊藤寛晃、喜多村佳委、櫻井香里、井上将行、抗がん活性天然物ヤクアミド B の標的タンパク質同定、第 60 回天然有機化合物討論会、2018.9.26–28
- (12) 三浦健介、伊藤寛晃、井上将行、ヤクアミド B の固相全合成研究、第 53 回天然物化学談話会、2018.7.4–6
- (13) 神谷光一、伊藤寛晃、井上将行、ヤクアミド B とその類縁体の統一的固相全合成、日本薬学会 第 138 年会、2018.3.25–28

- (14) 早田敦、伊藤寛晃、井上将行、ポリセオナミド B の細胞内動的挙動および作用解析、日本薬学会 第 138 年会、2018.3.25-28
- (15) 喜多村佳委、伊藤寛晃、櫻井香里、井上将行、抗がん活性天然物ヤクアミド B の作用機構解明、第 43 回反応と合成の進歩シンポジウム、2017.11.6-7
- (16) 高田悠里、伊藤寛晃、井上将行、グラミシジン A 類縁体のライブラリー構築とスクリーニング法開発、第 35 回メディスナルケミストリーシンポジウム、2017.10.25-27
- (17) Yuri Takada, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, Comprehensive Structure-Activity Relationship Study of Gramicidin A, KCL-Institute of Psychiatry, Psychology & Neuroscience - UT-GPLLI Joint Symposium, 2017.9.25
- (18) Yuri Takada, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, Comprehensive Structure-Activity Relationship Study of Gramicidin A, University of Strathclyde - University of Tokyo, 2017 Student Symposium, 2017.9.23
- (19) Yuri Takada, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, Comprehensive Structure-Activity Relationship Study of Gramicidin A, Dundee-Tokyo Postgraduate Research Symposium, 2017.9.22
- (20) Yuri Takada, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, Comprehensive Structure-Activity Relationship Study of Gramicidin A, CiMR-UTokyo Symposium 2017, 2017.9.18-19
- (21) Hiroaki Itoh, Kotaro Tokumoto, Takuya Kaji, Masayuki Inoue, Total Synthesis and Biological Mode of Action of WAP-8294A2: A Menaquinone Targeting Antibiotic, Chirality 2017 ISCD-29, 2017.7.9-12

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：環状ペプチド系抗菌化合物

発明者：井上将行、伊藤寛晃

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2019-33041

出願年：2019

国内外の別：国内

〔その他〕

(1)ホームページ等

東京大学大学院薬学系研究科天然物合成化学教室ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~inoue/>

(2)発表論文 3 関連

①東京大学大学院薬学系研究科プレスリリース：

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?page=2&key=1535624631>

②Spotlights on Recent JACS Publications への選出：

DOI: 10.1021/jacs.8b10444

(3)発表論文 4 関連

①東京大学大学院薬学系研究科プレスリリース：

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?page=3&key=1532528078>

②Chem-Station スポットライトリサーチ：

<https://www.chem-station.com/blog/2018/09/polytheonamideb.html>

(4)発表論文 6 関連

①ACS Editors' Choice への選出：

<https://pubs.acs.org/editorschoice/>

②The Journal of Organic Chemistry Outstanding Publication of the Year

③The three most read papers in JOC in 2018

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。