

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05719

研究課題名(和文) アムホテリシンB活性増強作用を持つ環状ペプチドの創薬研究

研究課題名(英文) Study on cyclic peptides with amphotericin B potentiating activity

研究代表者

長井 賢一郎 (Nagai, Kenichiro)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：30321649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：液相合成法によるAmB活性増強作用を持つネクトリアチドの合成を行った。構造活性相関の解明のため、アミノ酸を変換した誘導体を合成した。構造活性相関の結果から、ネクトリアチドの構成アミノ酸の立体化学、側鎖、N-メチル基、フェノール性水酸基、環状構造はAmB活性増強作用に大きく影響しないことを明らかにした。さらにC末、N末、フェノール性水酸基が保護された各種鎖状誘導体はネクトリアチドより高活性であった。構造活性相関を参考にして、ビオチン部位を持つプローブ分子を設計合成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、広い抗真菌スペクトルと強力な抗真菌活性を持つAmBを活用し、ネクトリアチドとの併用少量投与により副作用を減弱させる戦略であり、これまでの真菌の生育を直接阻害する抗真菌剤の開発とは全く異なる。その中で、ネクトリアチドより高活性な誘導体の合成に成功したことは、さらなる用量の減量につながる可能性がある。構造活性相関から設計したプローブ分子を利用してネクトリアチドの標的分子を探索した。現在も進行中であるが、未知の分子標的の発見、そして作用機構の解明に繋がり、その波及効果として新しい抗真菌剤の創薬戦略が生まれると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Synthesis of nectriatide with AmB potentiating activity has been attained. In order to elucidate the structure-activity relationship (SAR), derivatives replaced with different amino acids were synthesized by using the same synthetic strategy. The SAR indicates that N-methyl group, amino acid side chains, stereochemistry, and cyclic structures have small effects of on AmB potentiating activity. Furthermore, linear derivatives protected at N-terminal amino, C-terminal, and phenolic hydroxy group were more potent than nectriatide. On the basis of the SAR result, linear derivatives having a biotin moiety were designed and synthesized to elucidate the molecular target.

研究分野：天然物化学

キーワード：環状ペプチド アムホテリシンB 活性増強 ネクトリアチド

1. 研究開始当初の背景

深在性真菌症はカンジダ、アスペルギウス、クリプトコッカス等の真菌が肺、肝臓、腎臓、脳などの体内深部に侵入して引き起こされる感染症であり、近年、その増加傾向と重篤化が問題となっている。一般的に日和見感染症である深在性真菌症が問題となった背景には、臓器移植、抗がん剤や免疫抑制剤の使用、HIV 感染による免疫能の低下した患者の増加が挙げられる。超高齢化社会を向かえるわが国にとって、深在性真菌症の蔓延は予想される深刻な脅威であり、その対策は急務である。

一方、抗真菌剤の開発は豊富な種類を有する抗菌剤と比べ著しく遅れている。最大の理由は真菌とヒトが同じ真核生物として類似の構造と機能を持つことであり、両者の間で優れた選択毒性を出すことが難しく、臨床で使用されている抗真菌薬はポリエン系、ピリミジン系、アゾール系、キャンディン系の4系統10薬剤のみである。

この中でポリエン系抗真菌剤アムホテリシン B (AmB) は広い抗真菌スペクトルと殺菌的な作用を示し、治療効果も高いことから大半の深在性真菌症に対する第一選択薬として使われている。しかし、その作用点が真菌細胞膜のエルゴステロールであるため、ヒト細胞膜のコレステロールにも僅かに親和性を示し、腎障害や低カリウム血症等の重篤な副作用を引き起こすことが問題点とされている。

申請者のグループは、AmB の抗真菌活性を増強する化合物は AmB の投与量を削減しても同等の抗真菌作用を発揮し、かつ副作用を低減できると考えた。そこで微生物資源から AmB 活性増強物質の探索を実施した結果、*Nectriaceae* sp. BF114 の培養液中よりネクトリアチドを見出した。ネクトリアチドは L-バリン、N-メチル-L-チロシン、アンスラニル酸、L-アラニンから成る新規環状テトラペプチドであり、単独では *Candida albicans* に対して 512 µg/mL の高濃度でも抗真菌活性を示さない。一方、AmB とネクトリアチド (32 µg/mL) の併用は AmB の最少生育阻止濃度 (MIC) を 1.0 µg/mL から 0.13 µg/mL へ抗真菌活性を 8 倍増強した。また、細胞毒性や抗菌活性を高濃度でも活性を示さない。よってネクトリアチドは、AmB の有用な治療効果を維持したまま、その最大の問題点である副作用を少ない投与量によって減弱できる、これまでにない特性を有している。一方で微生物資源から本化合物の供給は困難な状況であり、さらなる研究展開は不可能であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ネクトリアチドを基盤とした創薬研究を進め、副作用の問題を抱えている深在性真菌症に対する新しい治療薬の開発である。そのためにネクトリアチドが真菌に対してどのように作用して AmB を増強するかを問いとして設定し、合成化学的手法によってのみ解決可能である構造活性相関研究を遂行する。そして、解析結果を参考に高活性な誘導体の設計と創製、並びにプローブ分子を活用した標的分子の解明に取り組む。

3. 研究の方法

(1) ネクトリアチドの合成法を確立し、アミノ酸残基を変換した誘導体を合成した。

(2) 抗真菌活性については CLSI M27-A3 法および M-38-A2 法に準じて、微量液体希釈法により酵母 *Candida albicans* ATCC90029 株に対する MIC を測定した。また AmB 活性増強作用については AmB と化合物を併用した時の真菌に対する MIC 値を測定した。

(3) 構造活性相関を参考にして、ピオチンの導入部位を設計し、プローブ分子を合成した。*Candida albicans* のタンパク質抽出液からプローブ分子を用いて標的分子を探索した。

4. 研究成果

(1) 2019 年度

ネクトリアチドの量的供給も視野に入れた液相合成を達成した。すなわち、すでに確立していた固相合成法を参考にアラニンメチルエステル塩酸塩より 9 ステップ総収率 46% でネクトリアチドを合成した。続いて合成中間体の AmB 活性増強作用を評価した。その中で C 末、N 末、フェノール性水酸基が保護された鎖状テトラペプチドが 2.0 µg/mL の濃度で AmB の MIC 値を 1.0 µg/mL から 0.031 µg/mL まで低下させ AmB 活性を 32 倍増強し、ネクトリアチドと比較して 16 倍低濃度の併用で活性を示すことを見出した。

(2) 2020 年度

ネクトリアチドの構成アミノ酸の立体化学、側鎖、N-メチル基、フェノール性水酸基、環状構造が AmB 活性増強作用にどのような役割を果たすかを確認するため、液相法で該当する各種誘導体を合成した。活性評価の結果、環状誘導体はネクトリアチドと同程度の活性を示した。これによりアミノ酸の立体化学、側鎖、N-メチル基、フェノール性水酸基は活性に大きく影響しないことを明らかにした。一方、C 末、N 末、フェノール性水酸基が保護された各種鎖状誘導体が 2.0 µg/mL の濃度で AmB の MIC 値を 1.0 µg/mL から 0.031 µg/mL まで低下させ AmB 活性を 32 倍増強し、ネクトリアチドと比較して 16 倍低濃度の併用で活性を示すことを見出した。

(3) 2021 年度

ネクトリアチドがどのように AmB 活性を増強するかを理解するため、プローブ分子の設計合成を行なった。ピオチンとアビジンの強い相互作用を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより標的分子を単離することを念頭におき、ピオチン部位の導入を検討した。構造活性相関の結果より、C 末、N 末、フェノール性水酸基が保護された各種鎖状誘導体が高い AmB 活性増強作用を示したため、これらの中から天然型 (L-バリン、N-メチル-L-チロシン、アンスラニル酸、L-アラニン) をリードに選定した。液相合成法を応用して C 末並び N 末の保護基を選択的に除去する方法を見出した。続いて C 末にはアミン PEG ピオチンを利用して、N 末には N ヒドロキシスクシイミド PEG ピオチンを利用して、C 末並び N 末にピオチン部位を導入したプローブ分子をそれぞれ合成した。両プローブ分子は高い AmB 活性増強作用を維持した。

研究協力者の協力のもと *Candida albicans* よりタンパク質抽出液を調整した後、プローブ分子を利用したプルダウン法によりタンパク質サンプルを得た。続いてタンパク質サンプルの SDS-PAGE を行い、結合タンパク質を銀染色して確認した。一方でアミン PEG ピオチンをコントロールとして同様の操作を行った。その結果、コントロールと比較してプローブ分子に特徴的なバンドが検出された。

(4) 今後の展望

合成した鎖状誘導体はネクトリアチドより高い AmB 活性増強作用を示した。これは新たな高活性誘導体やプローブ分子の設計に役立つ重要な知見である。標的分子の探索が成功するためには、活性を維持したプローブ分子の作成が重要となる。本研究では、すでに高活性なプローブ分子の合成に成功し、それを利用して特徴的なタンパク質を検出している。今後、さらに解析を進めることで標的分子が明らかとなれば、ネクトリアチドが AmB 活性を増強する作用機序の解明につながり、それによってネクトリアチドを基盤とした深在性真菌症に対する新しい治療薬の開発を促進できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashi Fukuda, Kenichiro Nagai, Akiho Yagi, Keisuke Kobayashi, Ryuji Uchida, Tadashi Yasuhara, and Hiroshi Tomoda	4. 巻 82
2. 論文標題 Nectriatide, a Potentiator of Amphotericin B Activity from Nectriaceae sp. BF-0114	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS	6. 最初と最後の頁 2673 - 2681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.8b01056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 カイコを用いた抗真菌剤 amphotericin B 活性増強化合物 nectriatide の簡易 in vivo 評価
2. 発表標題 三宅良介、小林啓介、長井賢一郎、大城太一、供田洋
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅 良介、長井 賢一郎、小林 啓介、供田 洋
2. 発表標題 抗真菌剤amphotericin B活性増強作用を示す真菌由来nectriatidelに関する研究
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 雪乃、長井 賢一郎、小林 啓介、福田 隆志、供田 洋
2. 発表標題 真菌由来 nectriatide の合成中間体が見せる抗真菌剤 amphotericin B 活性増強作用
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	内田 龍児 (Uchida Ryuji)	東北医科薬科大学 (31305)	
研究協力者	小林 啓介 (Kobayashi Keisuke)	北里大学 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------