

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2023
課題番号：20K05849
研究課題名(和文) 腸内細菌生産天然物コリバクチンによる大腸がん発症機構に関する有機化学的研究

研究課題名(英文) Bioorganic studies on the genotoxicity of colibactin produced from human microbiome in colorectal cancer

研究代表者
村上 一馬 (Murakami, Kazuma)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80571281
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの腸内には多くの外来細菌が生息し、片利共生関係が成立している。これらのバランスが破綻するとがんや神経変性疾患等の発症につながるが、病態に関わる2次代謝物(バイオーム分子)の構造や作用機構などその実体は不明な点が多い。本研究では、大腸菌が生産するコリバクチンと放線菌が生産するヒューマイシンを研究対象とし、化学合成、構造活性相関の解析、作用機構の解析を行った。その結果、コリバクチンの遺伝毒性においてシクロプロパン環や平面構造がDNA結合に必要であること、ヒューマイシン類縁体が食品産業と関わりの深い病原菌に対して抗菌活性とともに強いDNA結合活性を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
近年、ヒトの腸内における微生物群と疾患との関連性は各種オミクス解析によって明らかになりつつある。一方、疾患に関わりがある微生物が複数種同定されているものの、片利共生のインバランスのトリガーになりうる2次代謝物(バイオーム分子)の構造や作用機構などその実体は不明な点が多い。本研究では、代表的なバイオーム分子2種を例に挙げて、それらの遺伝毒性や抗菌活性に重要な役割を果たす構造因子の基礎的な知見を得たことは学術的に意義深い。特に、ヒューマイシン類縁体が食品産業と関わりの深い病原菌に対して強い抗菌活性を示すことを明らかにしたことは、今後の社会的有用性を予見させるものである。

研究成果の概要(英文)：There is a large number of ectoparasitic microbiota in human intestine, where a commensalistic relationship is established. These imbalances can lead to cancer and neurodegenerative diseases, but the structure and mode of action of secondary metabolites ("biome molecules") related to the pathology are still largely unknown. In this study, we investigated colibactin produced by *Escherichia coli* and humimycin produced by *Rhodococcus* spp. using organic synthesis, structure-activity relationship study, and target ID method. The results suggest that cyclopropane rings and planar structures may be required for DNA binding in the genotoxicity of colibactin. Humimycin analogues showed potent DNA binding activity as well as antibacterial activity against pathogens related to the food industry.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：腸内細菌 バイオーム分子 天然物化学 コリバクチン ヒューマイシン 標的探索 プロバイオティクス 片利共生

1. 研究開始当初の背景

ヒトに片利共生（片方が共生によって利益を得るが、一方にとっては利害が発生しない関係）する外来細菌は、腸管において腸内細菌叢を形成し、ヒトの健康状態に影響を与える。腸内細菌が2次代謝産物（図2A：“バイオーム分子”）を生産していることは50年以上前から示唆されているにも関わらず、構造や生理活性などその実体は不明な点が多い。これまで腸内細菌叢に関する研究は、疾患に影響を及ぼす細菌の種類と数を調べたオミクス解析が中心であり、生産化合物はプロピオン酸、酪酸、吉草酸の低級脂肪酸や胆汁酸等の一般的なものに留まっている。

大腸がんの発症に関わる腸内細菌 (*E. coli*) のバイオーム分子として、コリバクチンという細菌毒素の存在が指摘されている¹⁾。コリバクチンは、DNAを損傷することによって遺伝毒性を示す（図1A）。2019年、2つの独立したグループによって、コリバクチンの構造が報告されたが^{2a,b)}、両グループの提唱構造は開環型（前者）か閉環型（後者）で結論が分かれており、完全な決着には至っていないのが実情であった（図1A, B）。さらにDNA鎖の切断活性にはシクロプロパン環が関与している可能性が示唆されているのみである。

一方、ヒトに共生している病原性放線菌 (*Rhodococcus spp.*) 由来のバイオーム分子として、humimycin A (**2**) が知られている³⁾。**2**はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症 (MRSA) に対して抗菌活性を示す。従来のMRSA抗菌剤はβラクタム系低分子がほとんどであり、非天然アミノ酸を含むリポペプチドの例は初めてであったことから、その作用機構に興味をもたれた。

2. 研究の目的

このような背景の下、**1**について、不安定な開環型ではなく、安定な閉環型のコリバクチン（図1A:**1**）という切り口から、細胞内結合タンパク質を探索することを着想した。また**2**について、化学合成および構造活性相関の解析を通して作用機構の基盤解明を行うこととした。これら2つのバイオーム分子は生体にとって毒物あるいは抗菌剤というそれぞれ相反する役割をもつことを踏まえて、腸内細菌が片利共生になぜ必要なのか（なぜ生息場所として腸管を選んだのか）を明らかにすることを学術的問いと考えている。

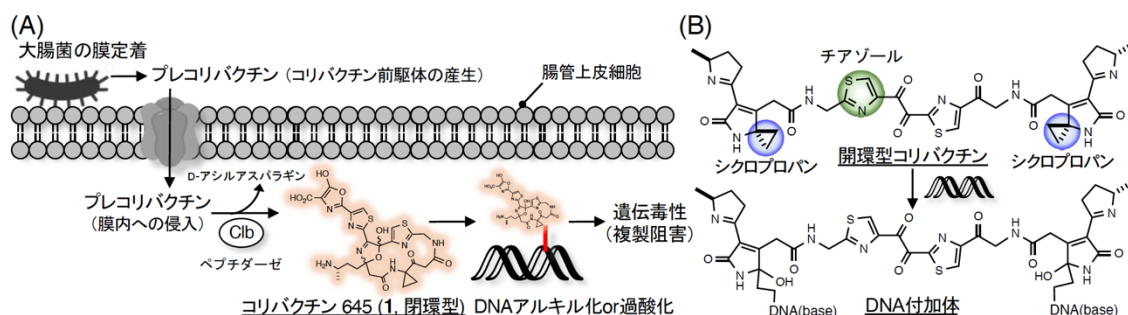


図1 (A) 閉環型コリバクチン(**1**)の産生と遺伝毒性機構。(B)開環型コリバクチンによるDNAアルキル化体。

3. 研究の方法

(1) **1** の合成

合成終盤での水系カップリング反応を企図して、両端の繰り返し構造（ユニットA）および中央のジチアゾール構造（ユニットB）に分けた合成を計画した。

(2) **2** の合成

2の合成はFmoc固相法で行った。脂肪酸部分は、(*R/S*)-3-hydroxymyristic acidの側鎖水酸基をイソブテンでtBu保護し、一つのアミノ酸としてペプチド合成機を用いた**2**の合成を計画した。

(3) ゲルシフトアッセイ

モデルプラスミド (pTS1 DNA/*Sac* I or pBR322) を用いてDNA結合能をゲルシフト法によって評価した。0.5%アガロースゲルで電気泳動し、SYBR II 蛍光溶液で染色することで、非結合DNAと結合DNAの割合を算出した。

(4) 抗菌試験

ブドウ球菌と同じくグラム陽性菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) など複数菌株を用いて、添加した化合物の生育阻止能をペーパーディスク法によって評価した。

4. 研究成果

(1) **1** の合成

合成終盤での水系カップリング反応を企図して、両端の繰り返し構造（ユニットA）および中央のジチアゾール構造（ユニットB）に分けて合成した。まず、Boc-L-Alanineを出発物質として、メルドラム酸エステルを介してBoc化ラクタムを高収率で得た。さらに、LDAを用いてチ

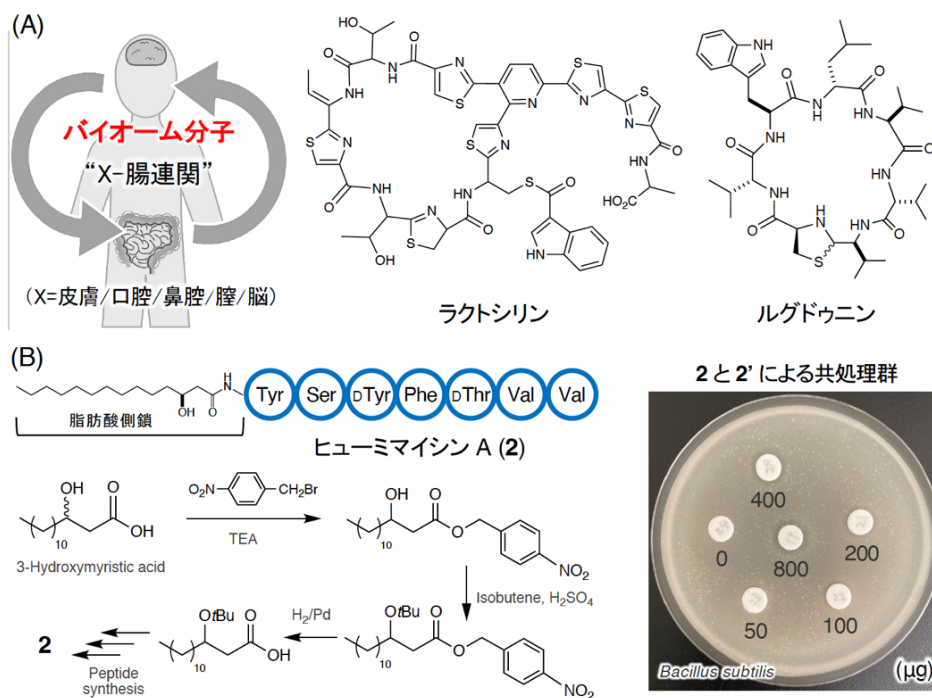


図 2 : (A)ヒト腸管内に共生する細菌叢は、バイオーム分子を生産することで各臓器と連関し、健康状態に影響を与える。例としてラクトシリンとルグドゥニンが知られる。(B) 2 の構造、合成経路と抗菌試験。

オ酢酸エチルで増炭した後、あらかじめ合成した 1-アミノシクロプロパンカルボン酸エチルからアミド体とした。最後に再びチオ酢酸エチルを LDA で結合させ、ユニット A を得た。

(2) 2 の合成

2 は N 末端が 3-ヒドロキシミリスチル化された、非天然アミノ酸を含むリポヘプタペプチドである。脂肪酸部分は、出発物質を 3-ヒドロキシミリスチル酸として、4-ニトロベンジルプロミドでカルボン酸部分を保護した後、イソブテンでエーテル保護した。Pd/C 存在下水素添加によって脱保護し、3-ヒドロキシミリスチン酸の tBu 保護体を得た。tBu 保護体をひとつのアミノ酸と見立てて、ペプチド合成機を用いたところ、側鎖水酸基部分の立体が S 体である 2 とともに、R 体であるジアステレオマー 2' を得た (図 2B)。天然体の 2 とともに、機能未知な 2' を初めて得た。

(3) ゲルシフトアッセイ

DNA アルキル化能が報告されているオリゴ DNA をモデル核酸として、結合シフトが可視化できるように、ゲル濃度 (トリス-ホウ酸-EDTA および尿素) と蛍光標識法の最適化を行った。1 について調べた結果、シクロプロパン環および平面構造が DNA 結合に必要な可能性が示唆された。2021 年、渡辺ら (静岡県立大) によって 1 の全容が明らかになり、シクロブタノールを含むユニークな構造であることが判明したことから⁴⁾、今後はシクロブタン等の寄与の有無も調べることで、標的探索用プローブの最適化を行う必要がある。

一方、2 についても調べたところ、2 による処理群ならびに 2 と 2' による共処理群において、DNA への付加体形成が示唆されるデータを得た。一方、2' の単独処理群では認められなかったことから、2 の脂肪酸部分の立体化学による抗菌活性への影響が明らかになった。

(4) 抗菌試験

2 は 100 µg 以上で生育阻止円を形成したが、2' の処理群では 400 µg を添加しても観察されなかった。興味深いことに、2 の抗菌活性は 2' の共存下で増大することがわかった (図 2B)。さらに食品産業と関わりの深い病原菌 3 種に対する抗菌活性を、微量液体希釈法により調べた結果、複数種のグラム陽性菌とグラム陰性菌に対する抗菌活性を示した⁵⁾。近年、2 と同じく 2 級水酸基をもつ commendamide が新たにバイオーム分子として同定されたことから⁶⁾、多剤耐性菌に対する抗菌活性をもつペプチド群として、脂肪酸や長鎖 N アシルアミドが有望かもしれない。

<引用文献> (二重線 : 研究代表者)

- 1) Nougayrede, J. P. *et al.*, **Science** 313, 848 (2006)
- 2) (a) Xue, M. *et al.*, **Science** 365, eaax2685 (2019); (b) Li, Z-R. *et al.*, **Nat. Chem.** 11, 880 (2019)
- 3) Chu, J. *et al.*, **Nat. Chem. Biol.** 12, 1004 (2016)
- 4) Zhou, T. *et al.*, **JACS** 143, 5526-5533 (2021)
- 5) 村上 アグリバイオ 7, 448-450 (2023).
- 6) Cohen LJ, *et al.*, **PNAS** 112, E4825-E4834 (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 村上一馬	4. 巻 7
2. 論文標題 腸内細菌生産天然物による創薬研究の新展開	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 448-450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 村上一馬	4. 巻 19
2. 論文標題 統計解析を駆使した生物活性物質の探索法 - アミロイド蛋白質の凝集を阻害するファンクショナルフードを例として -	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Functional Food Research	6. 最初と最後の頁 28-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村上一馬
2. 発表標題 アミロイド凝集を阻害する天然物の論理的探索法
3. 学会等名 第19回ファンクショナルフード学会学術集会（先端シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上一馬
2. 発表標題 Natural products derived from microbiota in the intestine as pharmaceutical resources
3. 学会等名 第51回 内藤コンファレンス マイクロバイオームの健康・医療への応用（発表確定済み）（国際学会）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuma Murakami	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 356
3. 書名 New Tide of Natural Product Chemistry (Chapter 15: High-Throughput Searches for Natural Products as Aggregation Modulators of Amyloidogenic Proteins)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻生命有機化学分野（研究代表者の所属研究室）ホームページ http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp 京都大学教育研究活動データベース（村上一馬） https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/zP8kX</p>
--

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	谷輪 厚太 (Taniwa Kota)	京都大学・農学研究科・大学院生 (14301)	

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
---------	---------