

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710215

研究課題名（和文） 昆虫寄生糸状菌を中心とした微生物からの自然免疫制御物質の探索と創製

研究課題名（英文） Exploration of Innate Immune Regulators from Microorganisms

研究代表者

菊地 晴久（KIKUCHI HARUHISA）

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：90302166

研究成果の概要（和文）：

独自に構築した自然免疫の活性化を検出するための評価系を用いて、微生物を中心とした天然資源についてスクリーニングを行った。その結果、gonytolide A や aspergillicin E をはじめとする多くの自然免疫制御物質を単離・同定した。また、自然免疫抑制物質 celastramycin A について合成法を確立し、これまでに報告されていた化学構造は誤りであり、ピロール環上の置換位置の異なる正しい構造を明らかにした。さらに、この合成法を基盤として20種類以上の誘導体を合成して、celastramycin A の構造活性相関を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To screen pharmaceuticals that target innate immunity, we established an *ex vivo* culture system based on the innate immune response of *Drosophila*, which is highly useful for identifying immune regulators that act on human innate immunity. We used this system to search for natural substances that regulate innate immunity, and identified aspergillicin E and gonytolide A as a potent suppressor and an activator, respectively. In addition, we synthesized some derivatives of celastramycin A to evaluate structure-activity relationship of these compounds.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：天然物化学・自然免疫・二次代謝産物・生物活性物質・ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は、感染初期に常在性の分子によって広範囲の異物を認識し、貪食細胞の活性化・抗菌ペプチドや炎症性サイトカインの産生などにより排除する生体防御機構であり、脊椎動物に限らず昆虫・植物など全ての多細胞生物に遺伝的に保存されている。これまで

免疫学では、抗原-抗体反応を主とする獲得免疫を中心として研究が進められてきたが、最近になって、哺乳類におけるTLR (Toll様受容体)の発見、さらに自然免疫の活性化が獲得免疫の成立に深く関与しているということが明らかとなり、自然免疫の重要性に大きな注目が集まっている。一方、自然免疫の異常

な機能低下や活性化はそれぞれ日和見感染症や敗血症といった人体に重大な障害を引き起こす。しかし、これらの疾病に対する有効な化合物はほとんど開発されておらず、敗血症治療薬として臨床段階にある eritoran や、抗炎症薬のリード化合物として研究が進められている NF- κ B 選択的阻害剤 DHMEQ が挙げられる程度である。

2. 研究の目的

本研究では、昆虫寄生糸状菌を中心とした天然資源からの自然免疫制御物質の探索を目的とする。自然免疫に影響を及ぼす低分子有機化合物は、新たな免疫医薬品のリード化合物として、また未だに不明な点が多い自然免疫の分子機構を解明するためのバイオプローブとして利用することが可能である。また、天然資源から得られた化合物について、その全合成及び誘導体合成を行い、より強力かつ選択的な活性を有した化合物の創製を行う。さらに、生物有機化学的手法・分子生物学的手法の両方を利用することで、得られた化合物の自然免疫制御機構の解明を目指す。

これまで、獲得免疫の影響を受けず自然免疫のみを高感度に検出する評価系は存在しておらず、自然免疫制御物質の探索を行うためには新たな評価系の確立が必須であった。我々は哺乳類と昆虫の自然免疫活性化機構には高い相同性があることに着目し、昆虫の中でも自然免疫研究のモデル生物として非常に広く利用されているショウジョウバエを用いて、自然免疫の活性化を検出するための独自の評価系をすでに構築している。ショウジョウバエが産生する抗菌ペプチドの一種 diptericin をコードする遺伝子の転写制御領域に、レポーター遺伝子として *lacZ* を導入したショウジョウバエ幼虫個体においては、自然免疫が活性化されて diptericin 遺伝子の転写が促進されると、同時に *lacZ* 遺伝子の転写も促進される。そこで *lacZ* がコードしている β -galactosidase を定量することで、自然免疫の活性化の程度を定量することが可能となる。この評価系を用いることで、本研究における目的を達成することができると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 天然資源からの自然免疫制御物質の探索

上記のショウジョウバエを用いる評価系により、様々な天然資源についてスクリーニングを行う。その探索源としては、自然免疫制御物質を介した生物間相互作用が期待される昆虫寄生糸状菌を中心とした微生物とする。

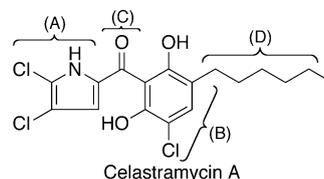
スクリーニングの結果、有望な微生物抽出物については、活性を指標に精製し、活性化

分の単離・構造決定を行う。単離された自然免疫制御物質については、TNF- α 刺激による HUVEC (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) の炎症性サイトカイン (IL-8, MCP-1) 産生量に対する影響を検討し、昆虫 (ショウジョウバエ) だけでなく哺乳類に対しても活性を示すかどうか確認する。

(2) 単離した化合物を基盤とする誘導体の創製

スクリーニングによって得られた有望な化合物について、様々な生物活性試験を行うのに十分な量を安定供給する目的で、その全合成を行う。また、より強力な活性を有した化合物の創製を目的として、種々の誘導体合成を行い、構造活性相関の検討を行う。

既に強力な自然免疫抑制作用を示すことが明らかとなっている celastramycin A については合成法を開発し、さらにその合成法を元に次のような celastramycin A 誘導体を合成する。A. ピロール環部位の変換：塩素原子から他のハロゲン原子への変換。窒素原子にアルキル基を導入。ピロール以外の含窒素芳香環への変換。B. ピロール環部位の変換：塩素原子から他のハロゲン原子への変換。窒素原子にアルキル基を導入。ピロール以外の含窒素芳香環への変換。C. カルボニル基を還元、またはチオカルボニル基等への変換。D. アルキル側鎖の長さまたは形状の変化 (下図)。



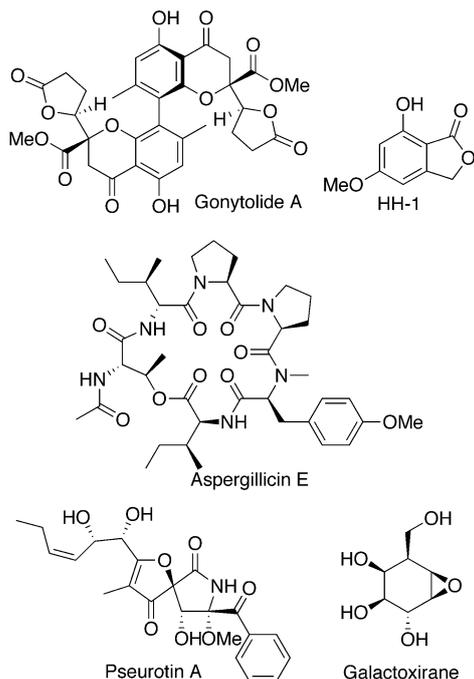
このようにして得られた celastramycin A 誘導体について自然免疫抑制活性を評価することで、活性発現に必要な部分構造についての情報を得る。さらに、強力な活性を有した合成誘導体については、敗血症モデルマウスを用いて *in vivo* 試験を行い、新規免疫医薬品のリード化合物の創製を行う。

4. 研究成果

(1) 天然資源からの自然免疫制御物質の探索

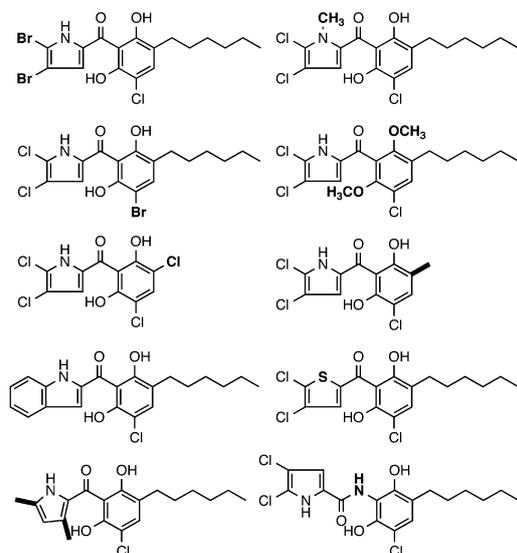
独自に構築した自然免疫の活性化を検出するための評価系を用いて、微生物を中心とした様々な天然資源についてスクリーニングを行った。その結果、自然免疫増強物質としてビスクロマノン構造を有した gonytolide A およびフタリド構造を有した HH-1 と称する新規化合物を得た。また、自然免疫抑制物質として pseurotin A, diheteropeptin, concanamycin B ならびに環状デプシペプチド aspergillicin E を得た。さらに、強力な β -ガラクトシダーゼ選択的阻害作用を有する新規化合物 galactoxirane も合わせて得られた

(下図).

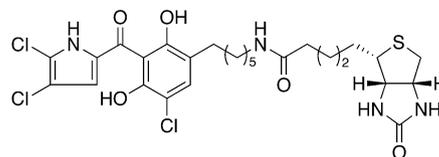


(2) 単離した化合物を基盤とする誘導体の創製

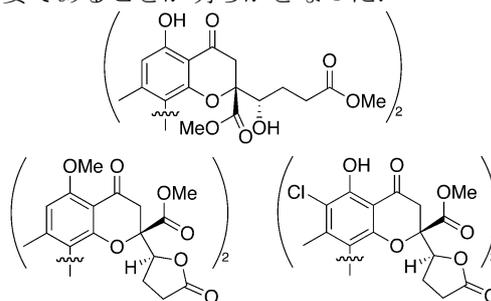
以前の研究で得られていた強力な自然免疫抑制物質 *celastramycin A* について、その合成法を確立した。その結果、これまでに報告されていた化学構造は誤りであり、ピロール環上の置換位置の異なる正しい構造を明らかにした。また、この合成法を基盤として、芳香環上の塩素原子を臭素原子に変換した化合物、アルキル側鎖の長さを変化させた化合物、窒素原子・酸素原子上にメチル基を導入した化合物、ピロール環を他のヘテロ環に変換した化合物など、20種類以上の誘導体を合成し、*celastramycin A* の構造活性相関を明らかにした（合成した化合物の例：下図）。



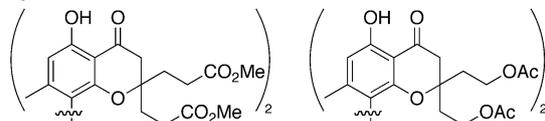
つづいて、上記の構造活性相関の知見を基盤として、その活性に大きな影響を与えないと考えられるアルキル側鎖末端にアミノ基を導入し、さらにビオチンを結合させた誘導体を合成した。この誘導体は、*celastramycin A* の約 100 分の 1 の活性を維持しており、自然免疫抑制作用の発現メカニズム解析を行うためのツールとして利用することが可能である（下図）。



一方、(1) で示した *gonytolide A* については、天然より得られた化合物を用いて γ -ラク톤を開環した誘導体、フェノール性水酸基をメチルエーテルに変換した誘導体、ベンゼン環上に塩素原子を導入した誘導体（下図）を合成し、その自然免疫増強作用を検討した。その結果、*gonytolide A* のビアリール構造が活性発現に必須であり、 γ -ラクトン部位は不要であることが明らかとなった。



つづいてこの知見をもとに、簡便な方法で合成可能な、構造を単純化した誘導体の創製をおこなった。その結果、ビス（メトキシカルボニルプロピル）基またはビス（アセトキシエチル）基を側鎖部分に有する *gonytolide A* 誘導体（下図）が、*gonytolide A* とほぼ同等の自然免疫増強作用を示すことが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. Sekiya, M.; Ueda, K.; Okazaki, K.; Terashima, J.; Katou, Y.; Kikuchi, H.; Kurata, S.; Oshima, Y. A phytoceramide analog stimulates the production of chemokines through CREB activation in human endothelial cells. *Int.*

- Immunopharmacol.* **2011**, in press (査読有) .
2. Kikuchi, H.; Okazaki, K.; Sekiya, M.; Uryu, Y.; Ueda, K.; Katou, Y.; Kurata, S.; Oshima, Y. Synthesis and Innate Immunosuppressive Effect of 1,2-Cyclopentanediol Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 1263-1273 (査読有) .
 3. Kikuchi, H.; Sekiya, M.; Katou, Y.; Ueda, K.; Kabeya, T.; Kurata S.; Oshima Y. Revised Structure and Synthesis of Celastramycin A, a Potent Innate Immune Suppressor. *Org. Lett.* **2009**, 11, 1693-1695 (査読有) .

[学会発表] (計2件)

1. 菊地晴久, 自然界からの感染症治療薬, 第9回東北国際保健研究会, 2010年5月30日, 東北大学医学部(招待講演)
2. 菊地晴久, 天然資源からの自然免疫制御物質の探索, 第51回天然有機化合物討論会, 2009年10月8日, 名古屋市公会堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 晴久 (KIKUCHI HARUHISA)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号 : 9 0 3 0 2 1 6 6

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし