

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780109

研究課題名（和文） レクチン様天然物 Pradimicin による糖認識機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of carbohydrate recognition by Pradimicins, natural small molecules with lectin-like properties

研究代表者

中川 優 (NAKAGAWA YU)

独立行政法人理化学研究所・伊藤細胞制御化学研究室・専任研究員

研究者番号：90452284

研究成果の概要（和文）：

Pradimicin (PRM) は、 Ca^{2+} イオン存在下 D-マンノース (Man) と特異的に結合する天然抗生物質群である。本研究では、「固相中での分子相互作用解析」という全く新しい解析戦略のもと、PRM と Man との複合体の固体 NMR 解析を行なった。その結果、PRM が Ca^{2+} イオンを介して Man と結合していることを明らかにするとともに、PRM における Man 結合部位を初めて特定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Pradimicins (PRMs) are natural antibiotics that recognize D-mannose (Man) in the presence of Ca^{2+} ion. In this study, a new strategy for analyzing molecular interaction of PRMs with Man in the solid state has been developed. The solid-state NMR analyses of the complexes of PRMs with Man revealed that PRMs bind Man in a Ca^{2+} -mediated manner, and successfully identified the Man binding site of PRMs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：Antibiotic, Carbohydrate recognition, Lectin, Natural product, Pradimicin, Solid-state NMR

1. 研究開始当初の背景

近年, 糖鎖は多彩な生物学的機能を持つことが明らかになり, 核酸やタンパク質と並ぶ第三の生命鎖として脚光を浴びている. それに伴い, 創薬のリードあるいは糖鎖の役割を解析するツール分子として, 特定の糖を認識する化合物 (糖レセプター) の需要が拡大しつつある. 特に, 非ペプチド性低分子化合物が水溶液中で糖を認識できることが実証されて以来, 供給面や化学的安定性の面で優れている低分子型の糖レセプターに対する興味と期待は急速に高まっている.

なかでも特に大きな注目を集めているのが, Pradimicin (PRM) 類である. PRM は放線菌由来の抗生物質であり, Ca^{2+} イオン存在下で D-マンノース (Man) を認識する. 現在のところ, 水溶液中で Man を認識する人工レセプターは報告されておらず, PRM は「唯一の非ペプチド性 Man レセプター」としてその学術的価値は高い. さらに近年, PRM がヒト免疫不全ウイルス (HIV) 上の糖鎖に結合することにより, HIV の標的細胞への侵入を阻害するとともに, 宿主免疫機構を利用して HIV を排除することが明らかにされた. この PRM の類稀な「Man 認識能」と前例のない「二段階抗 HIV 作用」は, 天然物化学, 糖鎖科学, 創薬化学など多くの研究分野から大きな関心が寄せられている.

2. 研究の目的

「PRM がいかに Man を認識しているのか」という問題は学術的に極めて重要なトピックであるが, その全容は全く明らかにされていない. その主な原因は, PRM が凝集性を有していること, また溶液中で Ca^{2+} イオンおよび Man と多数の複合体を形成することから,

一般的な X 線結晶構造解析や溶液 NMR 解析を適用することができなかつたことが挙げられる.

本研究では, 機器分析には不利とされている「凝集」という現象を逆に利用することにより, 「固相中での分子相互作用解析」という全く新しい解析戦略のもと, PRM と Man の結合様式を解析することを目的とした.

3. 研究の方法

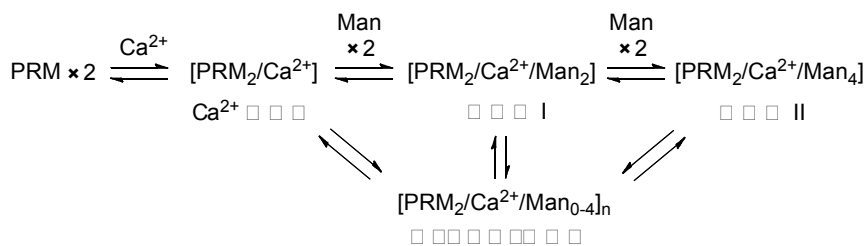
PRM は, Ca^{2+} イオンを介して二量体ユニットを形成し, この Ca^{2+} 複合体が 2 分子の Man を結合して複合体 I [$\text{PRM}_2/\text{Ca}^{2+}/\text{Man}_2$] となった後, さらに 2 分子の Man を結合して最終的に複合体 II [$\text{PRM}_2/\text{Ca}^{2+}/\text{Man}_4$] となると考えられている (スキーム 1). 溶液中においては, これらの複合体は互いに会合してオリゴマーあるいは凝集体を形成するため, 相互作用解析は極めて困難となる. 一方, 固体状態の凝集体においては, 液相中のような平衡は存在しない. 本研究ではこの点に着目し, 凝集という現象を利用して単一成分の PRM/ Ca^{2+} /Man 複合体からなる固体試料を作成し, その構造を固体 NMR で解析した.

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 凝集を利用した解析系の構築

PRM と Man は二段階で結合することが指摘されているが (スキーム 1), それぞれの段階の結合定数は評価されていなかった. そこで, 等温滴定カロリメトリー (ITC) を用いて PRM の一種・PRM-A (図 1) と methyl α -D-mannopyranoside (Man-OMe) の結合を解析した. その結果, 二段階結合に由来する特徴的な滴定曲線が得られ, 一段階目および二段階



スキーム 1 PRM と Ca^{2+} および Man との複合体形成機構

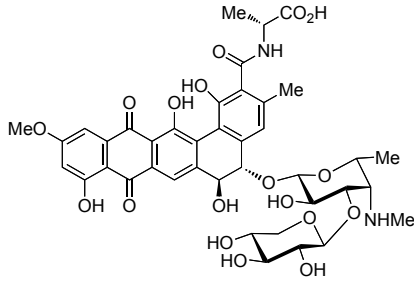


図1 Pradimicin A (PRM-A) の構造

目の結合定数は、それぞれ $10,400 \text{ M}^{-1}$, 263 M^{-1} と見積もられた。本結果は、一段階目の Man 結合は二段階目よりも約 40 倍強いことを示唆するものである。

そこで本知見に基づいて、PRM-A の凝集性と Man 結合における一段階目および二段階目の親和力の差を利用して、解析系の単純化を試みた。まず、 CaCl_2 と Man-OMe を用いて PRM-A/ Ca^{2+} /Man-OMe 複合体を固体の凝集体として調製した。この凝集体を酸処理して分解後、混合物中の Man-OMe/PRM-A 比を溶液 NMR で求めたところ、2.3 と算出され、凝集体の成分は主に複合体 II であることが確認された。一方、凝集体を水洗すると Man-OMe/PRM-A 比は洗浄回数依存的に減少し、最終的に 1.1 に収束した。本結果は、二段階目に低い親和力で結合した Man-OMe が水洗の過程で解離し、凝集体中の成分が主に複合体 I となったことを示唆している。つまり、凝集・水洗の過程を経ることにより、複雑な平衡状態の中から複合体 I の凝集体のみを選択的に取り出せることになる。このようにして調製した固体サンプルを用いれば、溶液中の複雑な平衡関係を考慮することなく、PRM-A と Man の 1:1 の相互作用を解析できることになる。そこで本研究では、複合体 I を構成成分とする凝集体を用いて、PRM-A と Man との一段階目の結合を固体 NMR で解析することにした。

② 固体 ^{113}Cd -NMR による Ca^{2+} 結合の解析

固相中での相互作用解析を行なう上で、まず着目したのは Ca^{2+} イオンの役割である。これまでの構造活性相関研究より、 Ca^{2+} イオン

は PRM のカルボキシル基と結合していることが指摘されている。しかしながら、 Ca^{2+} イオンが PRM とのみ結合するのか、あるいは Man とも結合するのかが不明である。この点を明らかにするため、 Ca^{2+} イオンのサロゲートとして $^{113}\text{Cd}^{2+}$ イオンを用いた固体 ^{113}Cd -NMR 解析を試みた。 $^{113}\text{Cd}^{2+}$ イオンは、 Ca^{2+} イオンと同程度のイオン半径を有するうえ、NMR 測定および解析が容易な核種であることから、 ^{113}Cd -NMR は Ca^{2+} イオンの化学的環境を解析する上で広く用いられている手法である。

まず、PRM-A と Man との結合において、 Cd^{2+} イオンが Ca^{2+} イオンのサロゲートとなりうるかどうかを評価した。凝集・水洗によって PRM-A/ Cd^{2+} /Man-OMe 複合体を調製したところ、その凝集体内の Man-OMe/PRM-A 比は 0.88 であった。一方、methyl α -D-glucopyranoside (Glc-OMe) 存在下で PRM-A/ Cd^{2+} 凝集体を調製した場合には、凝集体中に Glc-OMe はほとんど含まれていなかった。本結果より、PRM-A は Cd^{2+} イオン存在下においても Man-OMe と選択的に結合することが明らかになった。さらに、PRM-A/ Ca^{2+} /Man-OMe と PRM-A/ Cd^{2+} /Man-OMe 凝集体の固体 ^{13}C -NMR スペクトルが互いに類似していたことから、 Cd^{2+} イオンおよび Ca^{2+} イオン存在下で PRM-A は同様の凝集構造を形成することが確認された。

そこで、PRM-A/ $^{113}\text{Cd}^{2+}$ および PRM-A/ $^{113}\text{Cd}^{2+}$ /Man-OMe 凝集体をそれぞれ調製し、固体 ^{113}Cd -NMR を測定した。その結果、PRM-A/ $^{113}\text{Cd}^{2+}$ 凝集体においては、 $\text{Cd}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [-46 ppm] や $\text{Cd}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [-52 ppm] などカルボキシル基が結合した Cd 化合物のケミカルシフト値に近い -50 ppm 付近にブロードなシグナルを与え、 $^{113}\text{Cd}^{2+}$ イオンが Ca^{2+} イオンと同様に PRM-A のカルボキシル基に結合していることが支持された。一方、Man-OMe 存在下では大幅な高磁場シフトが認められ、-135 ppm にシャープなシグナルが検出された。本結果は、Man-OMe の結合によって $^{113}\text{Cd}^{2+}$ イオンの配位様式が変化することを強く示唆するものである。さらに、 ^{113}Cd シグナルの大幅な高磁場シフトは酸素

原子が $^{113}\text{Cd}^{2+}$ イオンに結合した時に認められることから、Man-OMe の水酸基が $^{113}\text{Cd}^{2+}$ イオンに直接結合することにより、 $^{113}\text{Cd}^{2+}$ イオンの配位様式の変化が引き起こされている可能性が考えられた。以上の考察から、PRM-A が Ca^{2+} イオンを介して Man と結合するという全く新しい結合様式を想定した。

③ DARR 解析による結合様式の検証と Man 結合部位の同定

上述の結合様式に基づくと、PRM-A における Man 結合部位はカルボキシル基付近ということになる。そこで、本結合様式の妥当性を検証するため、PRM-A/ Ca^{2+} /Man-OMe 凝集体の dipolar assisted rotational resonance (DARR) 解析を行なった。DARR は、6 Å 以内の距離にある ^{13}C 間をクロスピークとして検出する固体 NMR の方法論である。

PRM-A 産生菌の生合成反応を利用して標識パターンが異なる 3 種の ^{13}C 標識 PRM-A を調製し、 $[^{13}\text{C}_6]\text{Man-OMe}$ との分子間 DARR クロスピークを指標として Man 結合部位の同定を試みた。その結果、PRM-A の D-アラニン部分に対応する 17 位、17-Me、18 位と $[^{13}\text{C}_6]\text{Man-OMe}$ とのシグナル間に顕著な分子間クロスピークが検出され (図 2)、PRM-A のカルボキシル基と Man-OMe が空間的に近接していることが実証された。さらに、PRM-A の 3-Me、4、5、14 位においても分子間クロスピークが検出され、PRM-A の D-アラニン部分と ABC 環で形成される溝が Man 結合部位であることが明らかになった。一方、11-O-Me

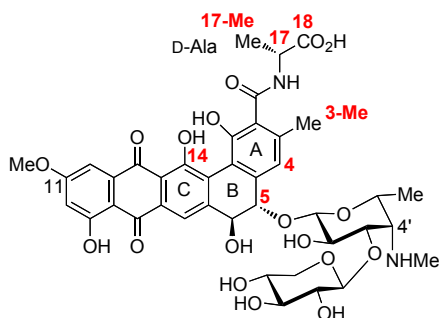


図 2 $[^{13}\text{C}_6]\text{Man-OMe}$ との分子間 DARR クロ

スピークが検出された部位 (赤字)

および 4'-N-Me においては、分子間クロスピークは検出されなかった。本結果より、これらの部位が Man との一段階目の結合には直接関与していないことが示されたと同時に、固体中で非特異的に結合した Man-OMe はほとんどなく、検出されたクロスピークはすべて特異的結合に由来することが確認された。

以上の結果とこれまでの構造活性相関の知見から推定される結合モデルを図 3 に示す。非常に興味深いことに、PRM-A の Man 結合様式は、超分子化学の研究分野で開発が進められている人工糖レセプターの設計コンセプトに合致する。すなわち、PRM-A の A 環部分は CH/ π 相互作用のための疎水性芳香環部分、D-アラニン、アントラキノン、および二糖部分が側鎖親水性ユニットと捉えることができる。これらの知見は、PRM による Man 認識機構の全容解明のための糸口を与えるだけでなく、人工 Man レセプターを設計する上での有用な指針となりうる。

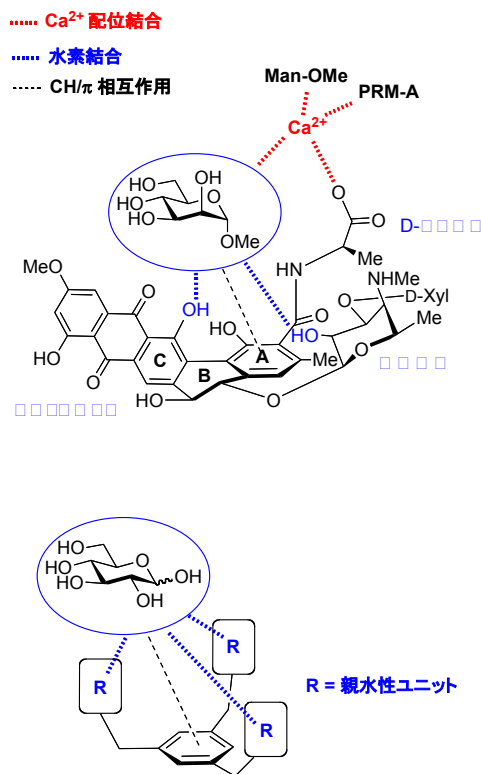


図 3 PRM-A と Man の推定結合モデル (上)

と人工糖レセプターの設計コンセプト (下)

④ PRM-A の水溶性アナログ・BMY-28864 とマンノースとの複合体の固体 NMR 解析

BMY-28864 (**1**) は, PRM-A の D-Ala 部分を D-Ser に置換した誘導体であり (図4), PRM-A の水溶性アナログとして作用機構解析や各種生物活性評価に広く用いられている. しかしながら, **1** が PRM-A と同様に Man を結合することを直接示す実験的証拠はなかった. そこで本研究では, 上述の固体 NMR を用いた解析戦略を **1** にも適用し, Ca^{2+} 配位様式と Man 結合部位の両面から PRM-A と **1** との比較を行なった.

まず, **1** の Ca^{2+} 配位様式を調べるため, $\mathbf{1}/^{113}\text{Cd}^{2+}/\text{Man-OMe}$ 複合体を固体サンプルとして調製し, 固体 $^{113}\text{Cd-NMR}$ スペクトルを測定した. その結果, PRM-A/ $^{113}\text{Cd}^{2+}/\text{Man-OMe}$ 複合体 [-135 ppm] に比べてわずかに低磁場側の -129 ppm にシャープな ^{113}Cd シグナルが観測された. ^{113}Cd シグナルは, $^{113}\text{Cd}^{2+}$ イオンの化学的環境に敏感に反応し, 800 ppm 以上にわたる広範囲のケミカルシフトを与えることから, PRM-A と **1** のケミカルシフトの僅かな差は $^{113}\text{Cd}^{2+}$ イオンの化学的環境に大きな違いがないことを示唆している. 本結果より, PRM-A と **1** の Ca^{2+} 配位様式はほぼ同様であることが確認された.

一方, Man 結合部位に関しては, **1** が PRM-A と同様にカルボキシル基付近で Man を結合するかどうかを DARR 解析により検証した. カルボキシル基と *N*-メチル基を ^{13}C 標識した **1** と [$^{13}\text{C}_6$]Man-OMe を用いて $\mathbf{1}/\text{Ca}^{2+}/\text{Man-OMe}$ 複合体を調製し, その DARR スペクトルを測定した. その結果, **1** のカルボキシル基が特

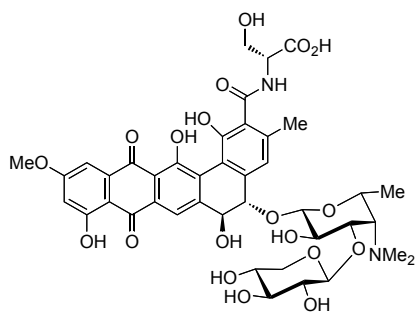


図4 BMY-28864 (**1**) の構造

異的に Man-OMe と近接していることが確認され, **1** も PRM-A と同様にカルボキシル基付近で Man を結合していることが確認された.

以上の結果より, **1** は PRM-A と同様に Ca^{2+} イオンおよび Man を結合していることが初めて実証された.

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

PRM は, 「唯一の低分子型 Man レセプター」として学術的に極めて興味深い分子であることから, その発見以来 20 年以上に渡って国内外の研究グループが PRM の Man 認識機構の解明に挑戦してきた. しかしながら, Man 結合部位に関する間接的な知見さえも全く得られておらず, いずれも研究の断念を余儀なくされている.

本研究は, PRM と Man の結合における Ca^{2+} イオンの役割を明らかにするとともに, Man 結合部位の特定に初めて成功し, PRM による Man 認識機構を解明する上で大きな前進を果たした. さらに本研究は, 固体 NMR のみでレセプター中のリガンド結合部位を同定した類稀な例として固体 NMR の研究分野にも大きなインパクトを与えた.

(3) 今後の展望

本研究によって PRM と Man との結合様式を解析するための方法論が完全に確立され, 近い将来, 「唯一の低分子型 Man レセプター」の分子認識機構の全容が解明されることが期待される. さらに, 本研究によって得られた知見は, 抗 HIV 薬としての PRM の構造最適化を行なう上で必要不可欠であり, 将来的に新規作用機序を有する抗 HIV 薬の開発にもつながることが予想される.

一方, 現在のところ, 超分子化学の最先端の技術を持ってしても人工 Man レセプターの開発は困難とされている. 本研究は, PRM の Man 認識機構が既存の人工糖レセプターの設計コンセプトに合致することを示し, 人工 Man レセプターを設計するための大きな手がかりを提示した. 本研究で提唱した結合モデルをさらに精密化することで, 初の人工 Man レセプターの創製につながることを期待される.

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 4 件)

- ① Nakagawa, Y., and Ito, Y. (2012) Carbohydrate-Binding Molecules with Non-Peptidic Skeletons. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, in press. (査読有)
- ② Nakagawa, Y., Doi, T., Takegoshi, K., Igarashi, Y., and Ito, Y. (2012) Solid-state NMR analysis of calcium and D-mannose binding of BMY-28864, a water-soluble analogue of pradimicin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 1038-1041. (査読有)
- ③ Nakagawa, Y., Doi, T., Masuda, Y., Takegoshi, K., Igarashi, Y., and Ito, Y. (2011) Mapping of the Primary Mannose-Binding Site of Pradimicin A. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 17485-17493. (査読有)
- ④ Nakagawa, Y., Masuda, Y., Yamada, K., Doi, T., Takegoshi, K., Igarashi, Y., and Ito, Y. (2011) Solid-state NMR Spectroscopic Analysis of the Ca²⁺-dependent Mannose Binding of Pradimicin A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 6084-6088. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中川 優, 土井崇嗣, 竹腰清乃理, 五十嵐康弘, 伊藤幸成: Pradimicin A の水溶性アナログ・BMY-28864 とマンノースとの複合体の固体 NMR 解析. 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 24 日, 京都.
- ② 中川 優, 増田裕一, 山田啓太, 土井崇嗣, 竹腰清乃理, 五十嵐康弘, 伊藤幸成: 固体 NMR による Pradimicin A のマンノース認識機構解析. 第 53 回天然有機化合物討論会, 2011 年 9 月 27 日, 大阪.
- ③ 中川 優, 増田裕一, 山田啓太, 土井崇嗣, 竹腰清乃理, 五十嵐康弘, 伊藤幸成: Pradimicin A による Ca²⁺ 依存的マンノース結合の固体 NMR 解析. 第 30 回日本糖質学会, 2011 年 7 月 13 日, 長岡.
- ④ 中川 優, 増田裕一, 山田啓太, 土井崇嗣, 竹腰清乃理, 五十嵐康弘, 伊藤幸成: Pradimicin A によるマンノース認識機構の固体 NMR 解析. 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 27 日, 京都.

[その他]

① RIKEN RESEARCH Highlights
<http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/research/6837>

② SpectroscopyNOW.com
<http://www.spectroscopynow.com/coi/cda/detail.cda?id=26834&type=Feature&chId=5&page=1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 優 (NAKAGAWA YU)

独立行政法人理化学研究所・伊藤細胞制御化学研究室・専任研究員

研究者番号: 9 0 4 5 2 2 8 4