

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710247

研究課題名（和文） 未利用微生物資源を探索源とする自然免疫制御物質の創出

研究課題名（英文） Exploration of Innate Immune Regulators from Unexploited 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、未利用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、terresterol および TM-DIF-1 といった自然免疫制御物質を得ることができた。また、これまでの研究で得られていた gonytolide A および aspergillicin F といった自然免疫制御物質について、その合成法を確立するとともに、各種誘導体の合成も行った。さらに、自然免疫抑制物質 celastramycin について、そのビオチンラベル化体を利用した標的分子の同定を試みた。

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 terresterol and TM-DIF-1 as an activator and a suppressor, respectively. In addition, we synthesized gonytolide A, aspergillicin F and their derivatives.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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・未利用微生物

## 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、ほぼ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、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- $\kappa$ B 選択的阻害剤 DHMEQ といった化合物が挙げられる程度である。したがって、自然免疫を制御する化合物の発見が望まれているのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、未利用微生物を中心とした天然資源由来の自然免疫制御物質の創出を目

的とする。昆虫寄生糸状菌・卵菌・ツボカビといった未利用微生物からは、宿主-寄生体相互作用に基づく新規自然免疫制御物質が得られる可能性が十分に考えられる。また、得られた自然免疫制御物質については、全合成および誘導体化を行うことで化学構造を最適化し、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の応用を目指す。

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構築した。この系では、ショウジョウバエが産生する抗菌ペプチドの一種 *dipterin* 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 *lacZ* を導入したショウジョウバエ幼虫個体を用いている。スクリーニングの対象となる化合物と共にこの個体を培養したのちに *lacZ* がコードしている  $\beta$ -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

前述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、主に昆虫寄生糸状菌・卵菌・ツボカビといった、宿主-寄生体相互作用に関与する自然免疫制御物質の産生が期待できる未利用微生物とする。

これらの微生物については、数種類の異なる培地 (Potato Dextrose 培地, Czapek-Dox 培地, SDY 培地, PY trehalose 培地 他) で振とう培養し、得られる菌糸体と培養後培地の抽出物を、前述の自然免疫活性試験に供する。

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、活性成分の単離・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- $\alpha$  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 の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した活性誘導体の創製

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。

放線菌から得られた *celastramycin A* は、これまでの研究で強力な自然免疫抑制作用を示すことが明らかとなっており、その全合成についても既に手法を確立している。この合成法を利用して、*celastramycin A* の各部位を変換した多くの誘導体を合成し、活性発現に必要な構造部位を明らかにしていく。

糸状菌より得られた自然免疫抑制物質 *aspergillicin E* は環状デブシペプチドである。本化合物については、まずその合成法を確立し、さらに、構成するアミノ酸をそれぞれ変化させることで種々の誘導体を合成し、その自然免疫抑制活性を評価することで、活性発現に必要な構造を明らかにする。

糸状菌より得られた *gonytolide A* は自然免疫応答増強作用を示すことが明らかとなっている。本化合物は多官能基化されたクロモン誘導体の二量体であり、それを全合成するのは困難であると考えられるため、その活性を維持しつつ、構造を単純化した誘導体の開発を目指す。

#### (3) 活性化化合物の自然免疫制御機構の解明

(2)までの結果を踏まえて、活性化化合物の蛍光ラベル化体、ビオチンラベル化体の合成を行い、細胞内における局在部位および標的分子の同定を行う。例えば蛍光ラベル化に関しては、低分子化合物の生物活性にあまり影響を与えないと考えられる比較的小さな蛍光発色団 NBD, BODIPY を用いる。

### 4. 研究成果

#### (1) 天然資源からの自然免疫制御物質の探索

ショウジョウバエを利用した自然免疫活性の評価系を用いて、昆虫寄生糸状菌・卵菌・ツボカビ・細胞性粘菌などの未利用微生物を中心とした各種天然資源についてスクリーニングをおこなった。その結果、卵菌の一種である *Saprolegnia terrestris* より新規ラノスタン型化合物 *terresterol* を自然免疫応答増強物質として単離した。本化合物の構造は、絶対構造も含め、各種スペクトルデータと構造変換により決定した。*Terresterol* は 10  $\mu\text{g/mL}$  以上で濃度依存的に自然免疫増強作用を示すことが明らかとなった (図 1)。

また、細胞性粘菌の分化誘導因子として知られている化合物 DIF-1 とその誘導体の自然免疫に対する作用を検討した結果、DIF-1 には選択的な作用はみられなかったが、そのフェノール性水酸基をメチル化した誘導体 TM-DIF-1 に濃度依存的かつ選択的な自然免疫抑制作用を見出した (図 2)。

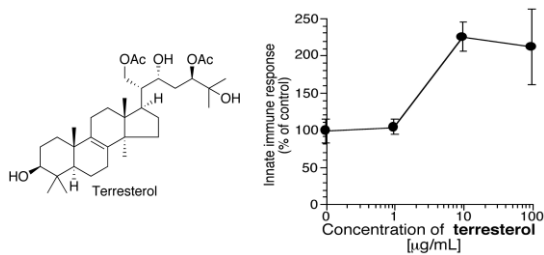


図1 Terrestrialol の自然免疫応答増強作用

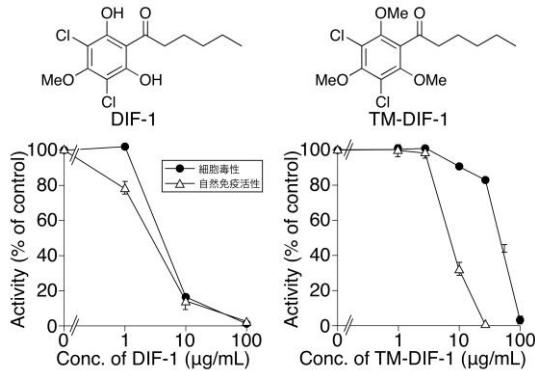


図2 TM-DIF-1 の自然免疫抑制作用

(2) 単離した化合物を基盤とした活性誘導体の創製

糸状菌より得られた自然免疫応答増強物質 gonytolide A は、これまでの研究により、その $\gamma$ -ラクトン開環体もまた自然免疫応答増強作用を示すことを明らかにしている。このことから、クロマノン環に結合した側鎖部分を単純化しても活性を示すと推測し、容易に合成可能な gonytolide 誘導体の創製を目指した。その結果、ビスクロモン型化合物 A ならびにビスフラボン型化合物 B が gonytolide A とほぼ同程度の自然免疫増強作用を示すことが明らかとなった (図3)。

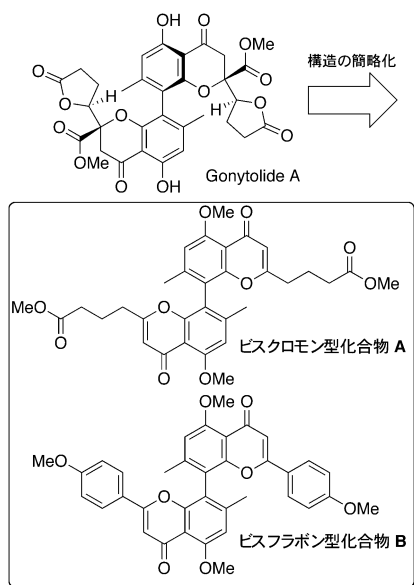


図3 合成した gonytolide A の活性誘導体

糸状菌より得られた自然免疫抑制作用を示す化合物は、以前の研究で環状デブシペプチド aspergillicin E であると推定されていた。その構造活性相関研究を行うことを目的として、まず aspergillicin E の合成法の開発を検討した。

L-プロリンを出発原料として、順次ペプチド鎖を伸長させることでヘキサペプチド C とし、両端の保護基を外した後に環化させることで、aspergillicin E の合成を達成した。しかし、得られた合成品と天然物の NMR スペクトルは一致しなかった。詳細なスペクトル解析の結果、自然免疫抑制作用を示した天然物の構造は aspergillicin E ではなく、その立体異性体である新規化合物 aspergillicin F であると推測された。実際に aspergillicin F を合成し、その NMR スペクトルを天然物と比較した結果完全に一致し、その構造が正しいことが明らかとなった (図4)。

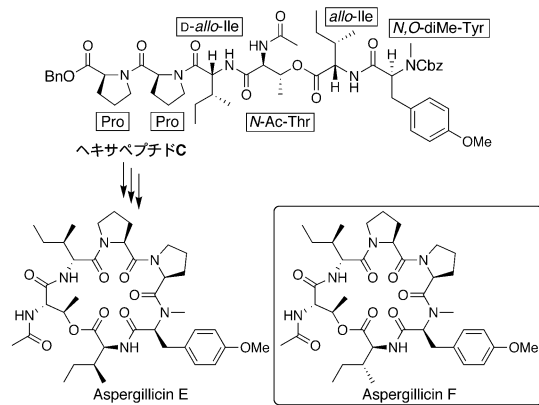


図4 Aspergillicin E および F の構造

(3) 活性化合物の自然免疫制御機構の解明

これまでに、強力な自然免疫応答抑制作用を示す celastramycin A のビオチン化誘導体 CeA-biotin を合成している。これを用いて、ビオチン-ストレプトアビジン間の強力な相互作用を利用した標的分子の同定を目指した。

まず、ネガティブコントロールとして、自然免疫応答抑制作用を示さないメトキシ化体 Methoxy-CeA-biotin の合成を行った。つづいて、両ビオチン化体をショウジョウバエ由来 S2 細胞に作用させ、その細胞の溶解液をストレプトアビジンでコーティングされた磁性ビーズによって精製した。得られた精製後タンパク質の電気泳動を行った結果、CeA-biotin を作用させた場合でのみ検出されるバンドが 60 kDa 付近に得られた (次頁図5)。このバンドが celastramycin A の標的タンパク質に相当すると考えられる。

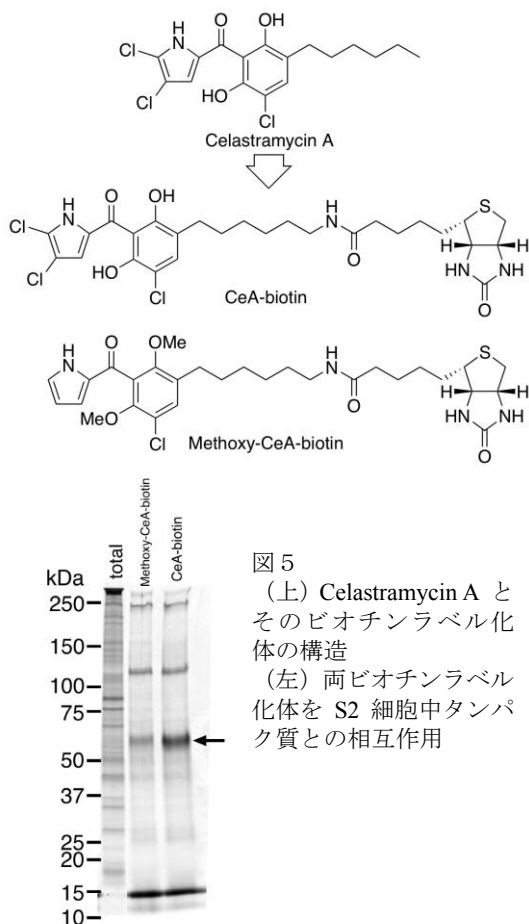


図5  
 (上) Celastramycin A と  
 そのビオチンラベル化  
 体の構造  
 (左) 両ビオチンラベル  
 化体を S2 細胞中タンパ  
 ク質との相互作用

#### 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6件)

1. Kikuchi, H.; Kubohara, Y.; Nguyen, V. H.; Katou, Y.; Oshima, Y. Novel Chlorinated Dibenzofurans Isolated from the Cellular Slime Mold, *Polysphondylium filamentosum*, and Their Biological Activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, in press (査読有) . DOI: 10.1016/j.bmc.2013.05.022
2. Kikuchi, H.; Sato, Y.; Kurata, S.; Katou, Y.; Oshima, Y. Terrestrial, a Polyoxygenated Lanostanoid, Isolated from the Oomycete *Saprolegnia terrestris*, and Its Innate Immune-Promoting Activity. *Tetrahedron* **2013**, 69, 3536-3542 (査読有) . DOI: 10.1016/j.tet.2013.02.088
3. Kikuchi, H.; Matsuo, Y.; Katou, Y.; Kubohara, Y.; Oshima, Y. Isolation, Synthesis and Biological Activity of Biphenyl and *m*-Terphenyl-Type Compounds from *Dictyostelium* Cellular Slime Molds. *Tetrahedron* **2012**, 68, 8884-8889 (査読有) .

DOI: 10.1016/j.tet.2012.08.041

4. Kikuchi, H.; Isobe, M.; Kurata, S.; Katou, Y.; Oshima, Y. New Dimeric and Monomeric Chromanones, Gonytolides D-G, Isolated from the Fungus *Gonytrichum* sp. *Tetrahedron* **2012**, 68, 6218-6223 (査読有) . DOI: 10.1016/j.tet.2012.05.064
5. Kikuchi, H.; Isobe, M.; Sekiya, M.; Abe, Y.; Hoshikawa, T.; Ueda, K.; Kurata, S.; Katou, Y.; Oshima, Y. The Structures of the Dimeric and Monomeric Chromanones, Gonytolides A-C, Isolated from the Fungus *Gonytrichum* sp. and Their Promoting Activities of Innate Immune Responses. *Org. Lett.* **2011**, 13, 4624-4627 (査読有) . DOI: 10.1021/ol2018449
6. 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**, 11, 1497-1503 (査読有) . DOI: 10.1016/j.intimp.2011.05.001

[学会発表] (計7件)

1. グウェンバンハイ, 菊地晴久, 倉田祥一朗, 加藤泰弘, 大島吉輝 未利用微生物・細胞性粘菌由来化合物からの自然免疫抑制物質の探索, 日本薬学会第133年会, 2013年3月29日, パシフィコ横浜(横浜)
2. 佐久間直之, 加藤泰弘, 壁谷尚宏, 倉田祥一朗, 菊地晴久, 大島吉輝 自然免疫抑制物質 celastramycin A の作用分子メカニズムの解析, 日本薬学会第133年会, 2013年3月28日, パシフィコ横浜(横浜)
3. 星川毅, 菊地晴久, 阿部由布子, 藤村信平, 倉田祥一朗, 大島吉輝 天然資源より得られた自然免疫増強物質の誘導体合成と生物活性, 第30回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2012年11月29日, タワーホール船堀(東京)
4. Haruhisa Kikuchi Biologically Active Compounds Isolated from Unexploited Microorganisms. International Symposium of Pharmaceutical Sciences, 2012年5月26日, Soochow University (中国・蘇州市)(招待講演)
5. 星川毅, 菊地晴久, 阿部由布子, 倉田祥一朗, 大島吉輝 自然免疫増強物質 gonytolide A の誘導体合成と生物活性, 日本薬学会第132年会, 2012年3月29日, 北海道大学(札幌)
6. Haruhisa Kikuchi, Mizuki Sekiya, Yasuhiro

Katou, Shoichiro Kurata, Yoshiteru Oshima  
Exploration of Innate Immune Regulators  
from Natural Resources. AIMECS2011, 2011  
年 11 月 30 日, 京王プラザホテル (東京)

7. 藤村信平, 菊地晴久, 中村哲也, 倉田祥  
一朗, 加藤泰弘, 大島吉輝 環状デブシペ  
プチド aspergillicin E の自然免疫応答抑  
制作用とその合成研究, 第 50 回記念日本  
薬学会東北支部大会, 2011 年 10 月 30 日,  
東北薬科大学 (仙台)

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