

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660099

研究課題名(和文)マンノース結合活性を有する新規天然物の探索

研究課題名(英文)Screening of natural products for novel mannose-binding agents

研究代表者

中川 優(Nakagawa, Yu)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：90452284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マンノース結合能を有する新規天然物の発見を目指し、マンノース結合性抗生物質 Pradimicin A およびオリゴマンノース固定磁気ビーズを利用した二種のスクリーニング系を構築した。さらに、本スクリーニングに利用する天然物ライブラリーの作成の過程で、ヒト子宮頸癌由来の HeLa-S3 細胞に対して毒性を示す Quinocidin を見だし、本化合物が 3,4-dihydroquinolizinium 環を母核とする極めて稀な新規天然物であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In an attempt to discover new natural products with D-mannose (Man)-binding ability, we have developed two screening methods using pradimicin A, a Man-binding antibiotic, and oligomannose-attached magnetic beads. Additionally, during the process to prepare a natural product library for the screening, we isolated a new natural product, named quinocidin, with cytotoxicity against HeLa-S3 cells derived from human cervix adenocarcinoma. Structural elucidation revealed that quinocidin possesses a 3,4-dihydroquinolizinium skeleton, which has very rarely been observed in natural products.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物 糖鎖 pradimicin 糖結合性分子 レクチン スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年、D-マンノース (Man) 結合能を有するタンパク質 (Man 結合性レクチン) が、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 表面に存在する糖鎖に結合し、HIV の標的細胞への侵入を阻害すると同時に、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 [Balzarini, *J. Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 583]. この2段階抗 HIV 作用は、既存の薬には全く認められないことから、現行の多剤併用療法とは異なる、全く新しい治療戦略として大きな注目を集めている。しかしながら、大部分の Man 結合性レクチンは供給や化学的安定性に問題があるうえ、強い副作用を有することから、レクチンそのものを抗 HIV 薬とすることは難しい。このような背景から、Man 結合能を有する低分子化合物の需要が急速に高まっているが、生理的条件下で Man を認識する人工分子は未だに開発されていない。現時点では、放線菌由来の天然物・pradimicin A (PRM-A, Fig. 1) が唯一の Man 結合性低分子であるが [Oki, *T. J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1701], PRM-A は凝集性を有するために創薬への展開は難しく、新たな Man 結合性低分子の発見が望まれている。

2. 研究の目的

本研究代表者はこれまでに、PRM-A と Man の複合体を凝集体として調製し、その構造を固体 NMR で解析することにより、PRM-A による Man 認識機構の概要を明らかにしてきた [Nakagawa, Y. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6084; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 17485; *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 10516]. その過程で、PRM-A とその類縁体 (PRM 類) がオリゴマンノースに強く結合し、赤色の凝集体を与えることを見いだしている。

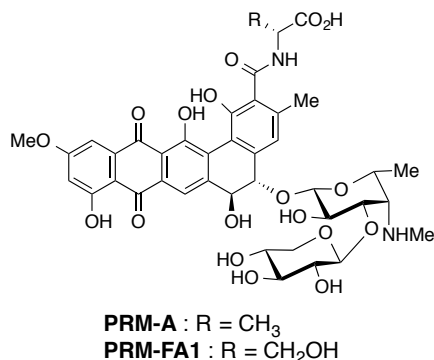


Fig. 1 Pradimicin A (PRM-A) とその類縁体 PRM-FA1

そこで本研究では、PRM 類のオリゴマンノースに対する結合能および凝集性を利用して、Man 結合性低分子を探索するためのスクリーニング系を構築し、天然物ソースから Man 結合能を有する新規低分子を発見することを目指した。

3. 研究の方法

本研究代表者は、PRM 類が分岐型マンノトリオース (TriMan) に対して強く結合し、赤色の凝集体を与えることを見いだしている。そこで本研究では、TriMan を利用して二種のスクリーニング系の構築を計画した。

(1) PRM 類の凝集性を利用したスクリーニング系の構築

本スクリーニング系の模式図を Fig. 2 に示す。PRM 類と試料の混合溶液に TriMan を添加し、Man 結合性分子が含まれていない場合は凝集体が検出される。一方で、試料に Man 結合性分子が含まれている場合には、PRM 類と TriMan の結合が阻害されるため、凝集が起こりにくくなる。結果として、凝集が認められない場合は、試料中に Man 結合性分子が存在する可能性があることを「目視」で検知できることになる。そこで、Man 結合性レクチン ConA を用いて PRM 類と TriMan の濃度を最適化しつつ、凝集の「有無」で ConA の存在を検知できるかどうかを検証した。

(2) 磁気ビーズを利用したスクリーニング系の構築

磁気ビーズは可磁化物質が一様に分布した高分子ポリマーのコアを親水性ポリマーで覆ったビーズであり、抗体などをビーズに固定することにより、目的のタンパク質を高純度で分離するために広く用いられている。

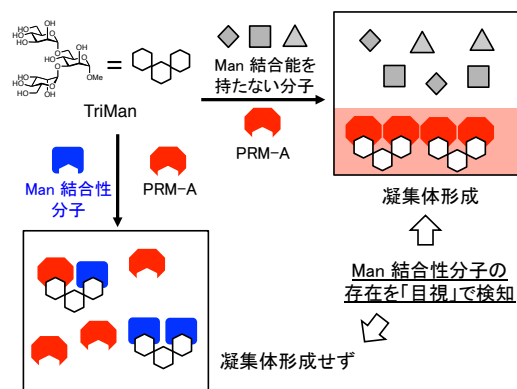


Fig. 2 PRM 類の凝集性を利用したスクリーニング系の模式図

そこで、TriMan を固定した磁気ビーズを合成し、本磁気ビーズによって PRM 類を捕捉できるかどうかを検証した (Fig. 3).

(3) 天然物サンプルの作成とスクリーニングの実施

HPLC を用いて天然物エキスの分画を行ない、精製された各種天然物（市販品あるいは本研究代表者が所属している研究室が保有している天然物）とともに上記スクリーニング系により Man 結合性天然物の探索を実施した。

4. 研究成果

[研究の主な成果]

(1) PRM 類の凝集性を利用したスクリーニング系の構築

本スクリーニング法においては、PRM 類が TriMan 非存在下では沈殿を形成せず、TriMan と結合して沈殿することが大前提となる。PRM-A は水溶性が十分ではなく、TriMan 非存在下でも水溶液中で一部析出することを考慮し、PRM-A よりも水溶性の高い PRM-FA1 (Fig. 1) を本スクリーニングに用いることとした。

まず、沈殿の形成が目視で明確に確認できる PRM-FA1 の量を調べるため、200 μ L の MOPS バッファー中 20 ~ 200 nmol の PRM-FA1 と等モル量の TriMan を用いて沈殿形成を観察した。その結果、40 nmol 以上の PRM-FA1 を用いた時に明確に赤色沈殿の形成が確認された。そこで次に、PRM-FA1 の量を 40 nmol に固定し、TriMan の量と沈殿形成の相関について調べた。その結果、TriMan が 16 nmol の時には凝集体が認められたが、12 nmol 以下の濃度においては PRM-FA1 は十分に凝集しないことが確認さ

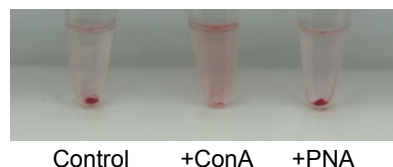


Fig. 4 沈殿試験

れた。本結果より、200 μ L 中 PRM-FA1 40 nmol および TriMan 16 nmol の条件がスクリーニングに適していると判断した。

そこで、この条件で Man 結合性低分子のスクリーニングが可能であるかどうかを検証するため、Man 結合性レクチンである Concanavalin A (ConA) と D-ガラクトース (Gal) 結合性レクチンである Peanut Agglutinin (PNA) 存在下で凝集試験を行なった (Fig. 4)。その結果、4 nmol の PNA 存在下ではレクチン無添加のコントロールと同様に沈殿が認められたのに対して、4 nmol の ConA 存在下では凝集体は観察されなかった。この結果から、本スクリーニング系は Man に結合する分子を特異的に検出できることが確認され、Man 結合性低分子の探索に利用可能であることが示唆された。

(2) 磁気ビーズを利用したスクリーニング系の構築

TriMan はアミド結合を介して磁気ビーズに固定することとし、磁気ビーズ A の合成を行なった (Fig. 5)。また、PRM 類が結合しない磁気ビーズとして非還元末端に Gal を有する三糖を固定した磁気ビーズ B もネガティブコントロールとして調製した。

オリゴ糖固定磁気ビーズに対する結合試験には Man に対する結合親和性の異なる 4 種の PRM 類 (PRM-A; $K_a = 2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$,

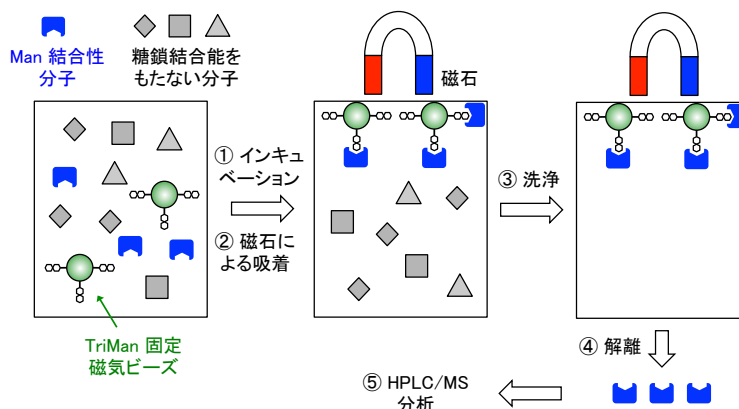


Fig. 3 磁気ビーズを利用したスクリーニング系の模式図

PRM-FA1; $K_a = 2.1 \times 10^6 M^{-1}$, PRM-Amide; $K_a = 2.4 \times 10^3 M^{-1}$, PRM-A Me ester; $K_a = <10^2 M^{-1}$) を用い (Fig. 1, Fig. 6), 各オリゴ糖固定磁気ビーズに捕捉される PRM 量を HPLC によって定量した. 具体的には, オリゴ糖固定磁気ビーズと PRM 類を MOPS バッファー中で混合し, 磁気ビーズを分離後, 磁気ビーズに結合した PRM 類を 50% アセトニトリルによって解離させ, その量を HPLC で定量するというものである. その結果, 磁気ビーズ A に対して PRM-A は 93%, PRM-FA1 は 68%, PRM-Amide は 55%, PRM-A Me ester は 34% と Man に対するアフィニティーの高さに依存して回収されていることが確認された. 一方で, 磁気ビーズ B では PRM-A が 30% 回収されたものの, PRM-FA1, PRM-Amide, PRM-A Me ester はほとんど検出されなかった. PRM-A が若干回収された原因としては PRM-A の凝集性が高く, 磁気分離時に凝集体が磁気ビーズに巻き込まれてしまった可能性が考えられる.

これらの結果により, TriMan 固定磁気ビーズによって PRM 類が特異的に捕捉されることが確認され, 本磁気ビーズが Man 結合性低分子の探索に利用可能であることが示唆された.

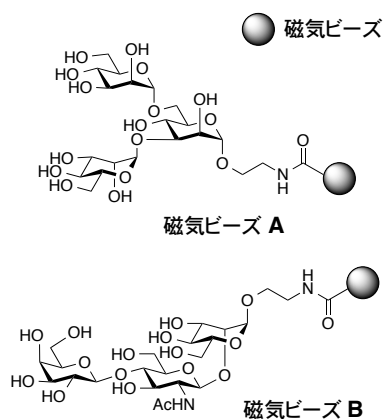


Fig. 5 磁気ビーズ A および B

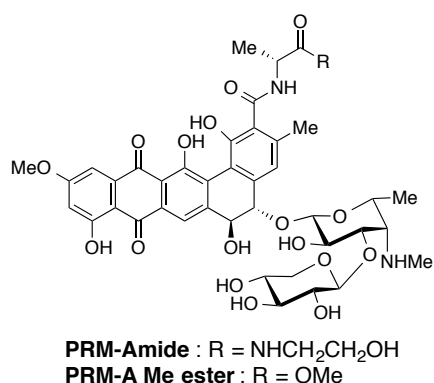


Fig. 6 PRM-Amide および PRM-A Me ester

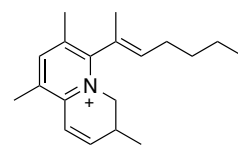


Fig. 7 Quinocidin

(3) 天然物サンプルの作成とスクリーニングの実施

オニヒトデ, アオヒトデ, 海綿, イワスナギンチャク, クロシタナシウミウシ, タツナミガイ, イボヤギ, ソフトコーラル, オオウミキノコなどのメタノール抽出物を酢酸エチルと水で分配し, 酢酸エチル層を HPLC (ODS) で 48 画分に分画して天然物サンプルとした. これらと本研究代表者が所属している研究室で単離同定された天然物および購入した天然物ライブラリーを合わせ, 計 1200 サンプルを用いてスクリーニングを実施した. PRM-FA1 を用いたスクリーニングの結果, 8 サンプルに PRM-FA1 の凝集抑制が認められたため, 等温滴定カロリーメトリー (ITC) を用いてこれらのサンプルが実際に Man と結合しているかどうかを評価した. その結果, いずれのサンプルも全く Man と結合しないことが確認され, 本スクリーニング系では Man 結合性低分子を見いだすことはできなかった. 現在 TriMan 固定磁気ビーズを用いたスクリーニング系での探索を試みているところである.

一方, PRM-A を産生する放線菌 *Actinomyces* sp. TP-A0019 の培養液から PRM 類以外の Man 結合性低分子を見いだせる可能性を考慮し, 本培養液からの新規天然物の探索を行なった. その結果, 2,3-dihydroquinolizinium 骨格を有する新規天然物 quinocidin (Fig. 7) を単離同定した. 本化合物は, Man 結合活性は示さないものの, ヒト子宮頸癌由来の HeLa-S3 細胞に対して毒性を示すことを見いだした.

[得られた成果の国内外における位置づけとインパクト]

糖鎖は, 精製, 構造解析, 化学合成が難しく, 遺伝子の直接の産物ではないためにリコンビナントを作成することもできないことから, 糖鎖の研究はタンパク質と比べて大幅に遅れていた. しかしながら近年, 糖鎖の生合成や分解に関わる遺伝子が相次いで取得されたとともに, 糖鎖合成技術が飛躍的に進

歩したことにより、糖鎖の生物学的機能が次々と明らかにされている。それに伴い、AIDS だけでなく、様々な難治性疾患において、糖鎖を標的としたユニークな創薬戦略が立案されつつある。

しかしながら、創薬リードとなりうる糖結合性分子が不足していることが問題となっている。その要因の一つとして、糖鎖結合活性を指標としたスクリーニング系が存在しないことが挙げられる。本研究は Man 結合活性を指標としたスクリーニング系の開発を初めて行ったものであり、本研究で確立した二種のスクリーニング系は、今後の Man 結合性低分子の探索研究に寄与することが期待できる。さらに磁気ビーズ B は Gal 結合性低分子の探索研究にも利用可能である。

一方、本研究で単離した quinocidin は、3,4-dihydroquinolizinium 環を有する類稀な天然物である。本複素環そのものを母核とする天然物は現時点では報告されていないことから、quinocidin の構造は学術的に極めて興味深いだけでなく、既存の抗がん剤とは異なるメカニズムで細胞毒性を発現している可能性も考えられることから、新規抗がん剤リードとしても十分期待できる。

[今後の展望]

研究期間内では Man 結合性分子の発見には至らなかったが、本研究によって確立したスクリーニング系を利用して、今後も探索を継続していく予定である。今後の研究によって、新しい Man 結合性低分子が発見できれば、抗 HIV 薬のリードを提示できるだけでなく、高分子のレクチンでは成し得なかった画期的な研究用ツール分子の開発につながる可能性があり、糖鎖生物学研究に新展開をもたらすことが期待される。また、本研究で開発したスクリーニング系自体も、利便性の高い技術として新規 Man 結合性レクチンの探索研究に貢献できる可能性がある。

一方 quinocidin に関しては、本化合物が水中でチオールと付加体を形成することを示唆する知見を得ている。本知見は、quinocidin が特定のタンパク質のシステイン残基に付加して細胞毒性を発現している可能性を示唆するものであり、その標的タンパク質の同定は新たな抗がん剤開発戦略に繋がることを期待される。今後、quinocidin をリードとした抗がん剤開発研究も展開していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Doi, T.; Nakagawa, Y.; Takegoshi, K. Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Analysis Reveals a Possible Calcium Binding Site of Pradimicin A, *Biochemistry* (2017) **56**(3), 468-472. 査読有, DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01300

[学会発表] (計 4 件)

1. 澤木裕紀, 中川 優, 木村高啓, 戸村友彦, 小鹿 一: 3,4-Dihydroquinolizinium 環を有する新規天然物の単離, 合成および生物活性評価. 第 111 回有機合成シンポジウム, 岡山大学 (岡山), 2017.6.8-9.
2. 宮西 航, 中川 優, 小鹿 一: 糖鎖結合性天然物の探索に向けたオリゴ糖固定磁気ビーズの合成と評価. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大学 (京都), 2017.3.17-20.
3. 澤木裕紀, 中川 優, 木村高啓, 戸村友彦, 小鹿 一: 3,4-Dihydroquinolizinium 環を有する新規天然物の単離, 構造決定および生物活性評価. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大学 (京都), 2017.3.17-20.
4. 中川 優: マンノース結合性天然物の糖認識機構解析: 糖鎖研究への利用を目指して. 理研シンポジウム, 理化学研究所 (埼玉), 2017.1.20.

[図書] (計 1 件)

1. Nakagawa, Y.; Ito, Y. Solid-state NMR Analysis of Mannose Recognition by Pradimicin A. In *NMR in Glycoscience and Glycotechnology*; Kato, K., Peters T., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2017; pp 269-289. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 優 (NAKAGAWA, Yu)

名古屋大学大学院・生命農学研究科・准教授
研究者番号: 90452284