

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05712

研究課題名(和文) プラディミシンを利用した糖鎖研究用ツールの開発

研究課題名(英文) Development of pradimicin-based research tools in glycobiology

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プラディミシン A (PRM-A) は、マンノース (Man) に結合するユニークな天然物である。Manは生物学的に重要な糖鎖の構成糖であることから、PRM-Aは糖鎖研究における貴重なツールとなる可能性を秘めている。しかしながら、PRM-Aは高い凝集性を有するために取り扱いが難しく、糖鎖研究に全く活かされていない。本研究では、PRM-Aの18位カルボキシ基あるいは二糖部分を構造改変することにより凝集性を大幅に軽減できることを見いだした。さらに本知見に基づいて、糖タンパク質の染色や真菌の検出に利用できるツールや用途に応じた機能性分子を連結できるPRM-A誘導体を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生命現象の包括的理解には糖鎖の機能解明が不可欠であるとの認識が広まっており、ゲノミクス、プロテオミクスに並んでグライコミクスの重要性が急速に高まっている。グライコミクス研究においては“高分子”の糖結合性タンパク質が広く利用されているが、本研究では天然由来の糖結合性“低分子”も利用できることを初めて実証した。本研究で得られた成果は、糖鎖科学分野における天然物利用の新たな可能性を提示するものであり、糖鎖科学および天然物化学の両分野における学術的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pradimicin A (PRM-A) is a unique natural product that binds D-mannose (Man). Although PRM-A holds great promise as research tools in glycobiology, the practical application of PRM-A has been severely limited by its inherent tendency to form water-insoluble aggregates. In this study, we found that structural modification at the C18 carboxy group or the disaccharide moiety of PRM-A effectively suppresses its aggregate-forming propensity. Based on this finding, we showed that structurally-modified derivatives of PRM-A can stain glycoproteins and fungi having Man-containing glycans. We also developed a semi-synthetic derivative of PRM-A, which can be connected to various functional molecules and thus would serve as a versatile compound for the future development of research tools in glycobiology.

研究分野：天然物化学

キーワード：Pradimicin 糖鎖 天然物 マンノース 糖タンパク質 研究用ツール

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、ホスト-ゲスト化学において最も捕捉しにくい分子の一つとされているのが糖である。糖は、多数のヒドロキシ基を有するために水分子と識別することが難しいうえ、立体異性体やアミノ糖などの類縁体と区別するのも極めて困難である。これらの問題から、水中で特定の糖に結合する分子の開発はチャレンジングな課題とされており、特に水中で D-マンノース (Man) を特異的に捕捉する人工分子の開発に成功した例はない。

一方、人工分子に成し得ない『水中での Man 捕捉』を実現する低分子化合物が天然には存在する。Pradimicin A (PRM-A) は放線菌由来の天然物であり (Fig. 1), 水中で Man と特異的に結合する。Man は生物学的に重要な糖鎖の構成糖であることから, PRM-A は糖鎖研究における貴重なツールとなる可能性を秘めている。しかしながら, PRM-A は高い凝集性を有するために取り扱いが難しく, 市販されているにも関わらず, 糖鎖研究に全く活かされていなかった。

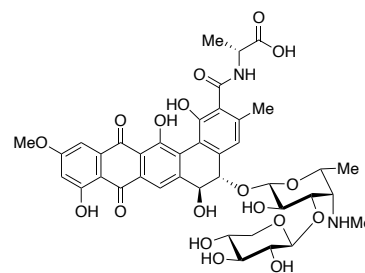


Fig. 1. Pradimicin A (PRM-A)

2. 研究の目的

本研究の開始時点において, 研究代表者らは「カルボキシ基のアミド化」という単純な構造変換によって, PRM-A の Man 認識能を保持したまま凝集性を大幅に抑制できる可能性があることを見いだしていた。そこで本研究では, PRM-A のアミド化を分子設計の基盤として, 糖タンパク質染色剤および酵母検出薬の開発を行うことを目的とした。さらに, PRM-A の二糖部分の構造改変も行ない, 糖鎖研究に利用できる新規誘導体の開発も試みた。

3. 研究の方法

各種誘導体は, 放線菌 *Actinomadura* sp. TP-A0019 から単離した PRM-A を原料として合成した。各種誘導体の凝集性および Man 結合活性は, 沈降試験および等温滴定カロリメトリー (ITC) 試験によって評価した。糖タンパク質の染色は, ポリフッ化ビニリデン (PFVD) 膜を用いたドットプロット法にて行なった。真菌の沈殿試験および抗真菌試験は, *Candida rugosa* を用いて行なった。

4. 研究成果

(1) 糖タンパク質染色剤の開発

PRM-A は赤色を呈することから Man を含む糖タンパク質の染色剤として応用できる可能性を考慮し, 水溶性の高いアミド誘導体 PRM-EA (Fig. 2) を合成した。沈降試験と ITC 試験の結果, 本誘導体は凝集することなく, Man と結合できることが確認された。そこで, 糖タンパク質 5 種と糖鎖をもたない bovine serum albumin (BSA) を PVDF 膜にプロットし, PRM-EA 溶液による染色を行った。その結果, 非還元末端に Man を有する糖鎖が付加された ovalbumin (OVA) と thyroglobulin (Tg) は赤色に染色された一方で, 非還元末端に Man をもたない糖鎖が付加された fetuin (Fet), transferrin (TRF), immunoglobulin G (IgG) や糖鎖自体をもたない BSA はほとんど

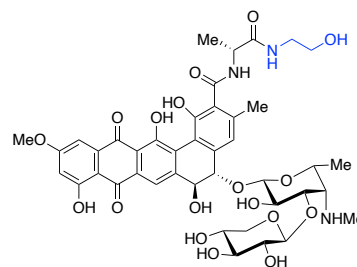


Fig. 2. PRM-EA

ど染色されなかった (Fig. 3)。現在のところ、Manを含む糖タンパク質を選択的に染色する色素は開発されていないことから、PRM-EAはユニークな糖タンパク質染色剤となりうる。

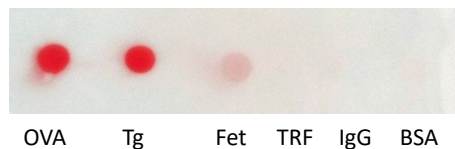


Fig. 3. Dot blot assay using PRM-EA

(2) 真菌検出薬の開発

真菌検出薬の設計コンセプトとして、『アミド結合を介して二分子のPRM-Aを連結することで真菌細胞を架橋して沈殿させる』、『PRM-Aが赤色を呈することを利用して真菌細胞の沈殿を染色する』の2点を考慮し、PRM-Dimerを合成した (Fig. 4; A, B)。凝集性とMan結合活性を評価したところ、PRM-Dimerは水溶液中で全く凝集せず、さらにPRM-Aと同等のMan結合活性を示すことが明らかになった。そこで、細胞表面にマンナン (Manを構成糖とする多糖) を有する *Candida rugosa* にPRM-Dimerを処理して顕微鏡で観察したところ、真菌の大きな塊が形成されることを確認できた (Fig. 4; C)。それに伴い、PRM-Dimerによって形成される *C. rugosa* の塊は、赤色沈殿として肉眼で明確に観察できた。これらの結果は、PRM-Dimerが真菌検出薬として利用できる可能性を示唆するものである。

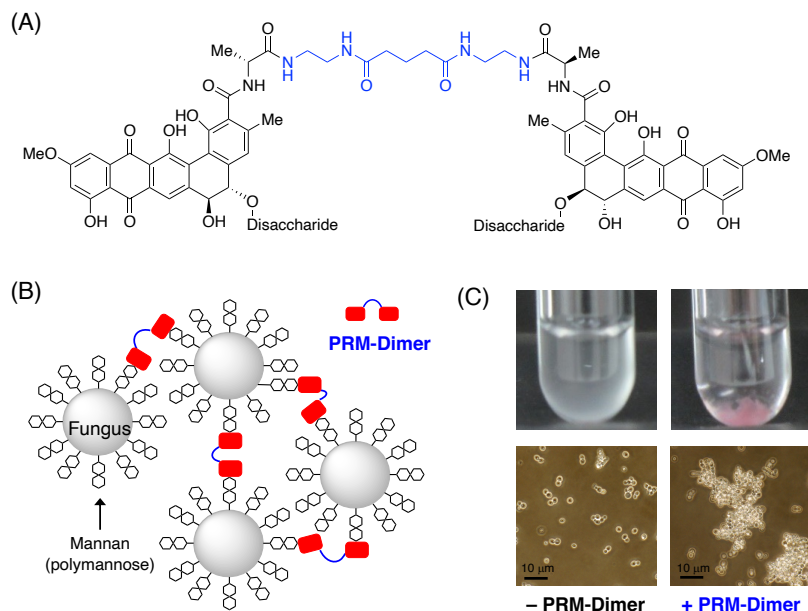


Fig. 4. PRM-Dimerの構造 (A), 設計コンセプト (B), および *Candida rugosa* を用いた沈殿・染色試験 (C)

(3) 多様な研究用ツールに誘導可能な鍵化合物の開発

「カルボキシ基のアミド化」以外の構造修飾で、糖鎖研究用ツールの創出に展開できる誘導体の開発も試みた。PRM-Aの二糖部分を改変した誘導体を系統的に合成し、それらの凝集性とMan結合活性を評価した。その結果、アジド糖を有する誘導体PRM-AS (Fig. 5) が凝集することなく、PRM-Aに匹敵するMan結合活性を示すことが明らかとなった。さらに、PRM-ASとプロピオール酸メチルとのヒュスゲン環化反応を行っても非凝集性とMan結合活性が保持されることが確認された。これらの結果は、クリックケミ

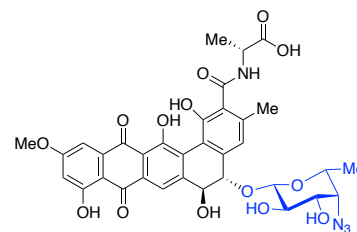


Fig. 5. PRM-AS

トリーによって PRM-AS に蛍光基などの機能性分子を容易に連結できる可能性を示しており、PRM-AS が糖鎖研究用ツール開発のための鍵化合物となりうることが示唆された。

(4) PRM-A に基づく抗真菌薬リードの開発

PRM-A は真菌のマンナンに結合して抗真菌活性を示す。そこで、「カルボキシ基のアミド化」を基軸として抗真菌薬リードの開発も試みた。様々なアミンを縮合した誘導体を系統的に合成し、凝集性と抗真菌活性を評価した結果、*N*-hydroxyamide 誘導体 PRM-HA (Fig. 6) が水溶液中で凝集することなく PRM-A に匹敵する抗真菌活性を示すことが明らかとなった。糖鎖を直接の標的とする抗真菌薬は未だに開発されていないことから、PRM-HA は全く新しい抗真菌薬のリードとして有望である。

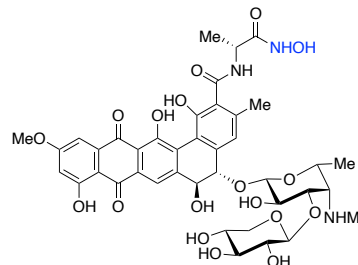


Fig. 6. PRM-HA

(5) PRM-A/Man 結合モデルの検証

研究代表者らは、X線結晶構造解析と固体NMR解析から得られた情報に基づいて PRM-A/Man 結合モデルを提唱している (Fig. 7; 左)。本モデルにおいては、Man のピラノース環内酸素原子が Ca^{2+} の配位水と水素結合を形成して PRM-A と Man の結合を安定化しているが、Man の環内酸素原子の役割に関する実験的知見はなく、その妥当性は不明であった。そこで、Man の環内酸素原子の役割に関する知見を得るため、本酸素原子を水素結合能が低い硫黄原子に置換したチオ糖を合成し、PRM-A との結合を評価した (Fig. 7; 右)。その結果、チオ糖は Man よりも低い結合活性を示すことが確認された。本結果は、Man の環内酸素原子が水素結合に関与していることを示しており、研究代表者らの提唱している結合モデルが妥当であることが確認された。

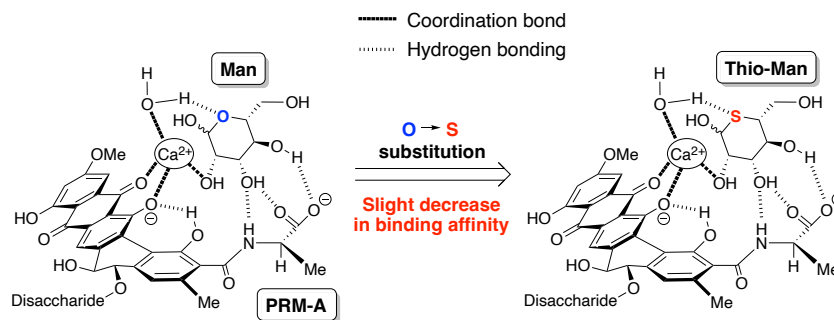


Fig. 7. Man (左) およびチオ糖 (右) と PRM-A との結合モデル

(6) Quinocidin の構造活性相関に関する解析

PRM-A 産生菌の培養液から単離される quinocidin (Fig. 8) は、3,4-dihydroquinolizinium 骨格を有するユニークな天然物であり、がん細胞の一種である HeLa-S3 細胞に対して毒性を示す。本研究の開始時点において、研究代表者らは本天然物の 3 位の立体配置が細胞毒性に影響を与えないことを明らかにしていたが、詳細な構造活性相関は不明であった。そこで、quinocidin のアナログを合成し、本天然物の構造活性相関を調べた。アナログ 14 種の細胞毒性を評価した結果、quinocidin の細胞毒性には pyridinium 環が重要であること、1, 2 位および 11, 12 位二重結合と 3 位および 11 位メチル基は重要ではないこと、および quinocidin の細胞毒性がアルケン側鎖の疎水性に依存していることが明らかとなった。合成したアナログの中で、**1** (Fig. 8) は quinocidin と

同等の細胞毒性を示し、かつ市販の化合物からわずか三段階で合成できることから、抗がん剤開発における有望なリード化合物となりうる。さらに、構造活性相関の知見に基づいて、細胞毒性を示すことなく、チオールと共有結合で付加するアナログ **2** (Fig. 8) も開発した。アナログ **2** は中性の水溶液中でシステインやグルタチオンにも付加することから、quinocidin はケミカルバイオロジー研究のツールとしても利用できる可能性が示唆された。

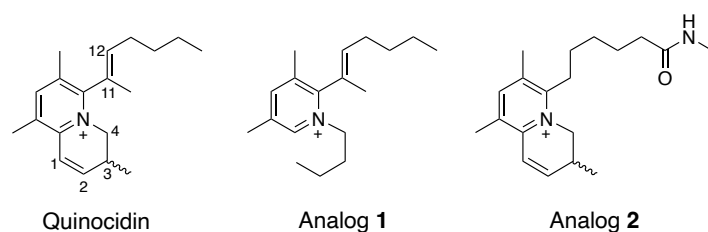


Fig. 8. Quinocidin およびアナログ **1, 2**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Nakagawa, Y.; Yamaji, F.; Miyanishi, W.; Ojika, M.; Igarashi, Y.; Ito, Y.	4. 巻 94
2. 論文標題 Binding evaluation of pradimicins for oligomannose motifs from fungal mannans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 732-754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200305	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 -
1. 著者名 Nakagawa, Y.; Doi, T.; Takegoshi, K.; Sugahara, T.; Akase, D.; Aida, M.; Tsuzuki, K.; Watanabe, Y.; Tomura, T.; Ojika, M.; Igarashi, Y.; Hashizume, D.; Ito, Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Molecular basis of mannose recognition by pradimicins and their application to microbial cell surface imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 950-959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2019.03.013	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 -
1. 著者名 Nakagawa, Y.; Sawaki, Y.; Miyanishi, W.; Shimomura, S.; Shibata, T.; Ojika, M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Relationship among structure, cytotoxicity, and Michael acceptor reactivity of quinocidin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2020.115308	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 -
1. 著者名 Watanabe, Y.; Yamaji, F.; Ojika, M.; Sugawara, T.; Akase, D.; Aida, M.; Igarashi, Y.; Ito, Y.; Nakagawa, Y.	4. 巻 61
2. 論文標題 The endocyclic oxygen atom of D-mannopyranose is involved in its binding to pradimicins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 151530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2019.151530	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 -

1. 著者名 Nakagawa, Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Paving the way for practical use of sugar-binding natural products as lectin mimics in glycobiological research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1567-1572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900781	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 -

1. 著者名 Miyanishi, W.; Ojika, M.; Akase, D.; Aida, M.; Igarashi, Y.; Ito, Y.; Nakagawa, Y.	4. 巻 55
2. 論文標題 D-Mannose binding, aggregation property, and antifungal activity of amide derivatives of pradimicin A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116590-116590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2021.116590	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 -

1. 著者名 Nakagawa, Y.; Kakahara, S.; Tsuzuki, K.; Ojika, M.; Igarashi, Y.; Ito, Y.	4. 巻 84
2. 論文標題 A Pradimicin-Based Staining Dye for Glycoprotein Detection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2496-2501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c00506	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 -

1. 著者名 Nakagawa, Y.; Ito, Y.	4. 巻 98
2. 論文標題 Mannose-binding analysis and biological application of pradimicins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 15-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.98.002	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18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 垣原真太郎, 宮西 航, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 Pradimicin Aのアミド誘導体を利用した糖タンパク質の染色
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川合計太郎, 小鹿 一, 中川 優
2. 発表標題 3,4-Dihydroquinolizinium化合物の合成とチオールに対する反応性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部 第187回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣原真太郎, 宮西 航, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 Pradimicinアミド誘導体の設計と糖タンパク質検出への応用
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第16回若手のカフェフォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 音田昂志, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 0-マンノシル化セリン/スレオニンに対するブラディミシンAの結合評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川合計太朗, 小鹿 一, 中川 優
2. 発表標題 不可逆的阻害剤への応用に向けた3,4-dihydroquinolizinium化合物の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大矢袖香, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 アミド化したプラディミシン誘導体の凝集性とマンノース結合活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮西 航, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 プラディミシンAのアミド誘導体の合成と活性評価
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田浦寛太, 都築麗江, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 Pradimicin Aの二量体による真菌の染色
3. 学会等名 第61回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 垣原真太郎, 都築麗江, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 ブラディミシンAのアミド誘導体を用いた糖タンパク質の染色
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中部支部2019年度合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮西 航, 小鹿 一, 中川 優
2. 発表標題 マンナン存在下での抗真菌試験に基づく糖結合性天然物の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川合計太郎, 小鹿 一, 中川 優
2. 発表標題 3,4-Dihydroquinolizinium化合物のチオールに対する反応性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣原真太郎, 都築麗江, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 ブラディミシン誘導体を利用した糖タンパク質の染色
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大矢 柚香, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 マンノースとの結合におけるプラディミシンAの二糖部分の役割
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 音田 昂志, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 プラディミシンAの非凝集性アジド含有誘導体の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 将人, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 プラディミシンと複合型糖鎖との相互作用の化学的検証
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 音田 昂志, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 糖結合性天然物プラディミシンの低凝集性誘導体の開発
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第17回若手の力フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 音田昂志, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 0-マンノシル化タンパク質検出ツールの開発に向けたプラディミシンの誘導体化
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井将人, 小鹿 一, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優
2. 発表標題 プラディミシンと複合型糖鎖の相互作用解析
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プラディミシンのマンノース認識機構と菌細胞表面イメージングへの応用 (ユサコ株式会社: 日本人論文紹介) https://www.usaco.co.jp/article/detail.html?itemid=1064&dispmid=610

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

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