

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02869

研究課題名（和文）結核に対抗するための新規分子標的の同定

研究課題名（英文）Identification of new target molecule using natural products: Toward development of anti tuberculosis molecules

研究代表者

品田 哲郎 (Tetsuro, Shinada)

大阪公立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30271513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：結核は今なお世界の人々の脅威となっている感染症の一つである。結核に対する有効な治療薬の開発は重要な取り組みとなっている。ペプチド系天然物の一つであるアントリマイシン類は抗結核活性を示すことが知られている。一方で、その標的分子は未解明のままであった。本研究では、アントリマイシンの標的分子の同定を目的とし、天然物の全合成、構造活性相関、抗結核活性評価、合成化合物を用いた標的分子の解析を含む生物有機化学的研究を行った。その成果として、天然物の全合成経路を開拓するとともにいくつかの標的分子候補を見出すに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界保健機構（WHO）が警鐘を鳴らし続けているように、結核を制御・抑制する薬剤開発は世界的に重要な課題である。その解決法の提供は、貧困をなくす、健康社会をつくるといったSDGs項目に合致する。本研究で得られた成果は、結核に対抗する新しい薬剤開発にむけた分子基盤を提供するものであり、健康社会の実現に貢献する社会的意義を備えている。現在、天然物の標的分子の絞り込みが進んでいる。研究をさらに進めることによって新しい抗結核薬創出に向けた一歩を踏み出すことができるようになることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Tuberculosis (TB) is one of the contagious and infectious diseases caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). TB drug discovery and development recognize an important subject in the world. In this study, we focused on antrimycins which display anti-Mtb activities. Although these natural products were found ca. 50 years ago, the mode of action and target molecules have been unknown. These facts prompt us to study the target molecule(s) of antrimycins by total syntheses, biological activity tests, and screening of the target molecules using the synthetic antrimycins. As a result, we found several candidate molecules which would associate with the mode of action of antrimycins. These results would contribute to the development of efficient anti-Mtb drugs based on the antrimycins and its target molecule.

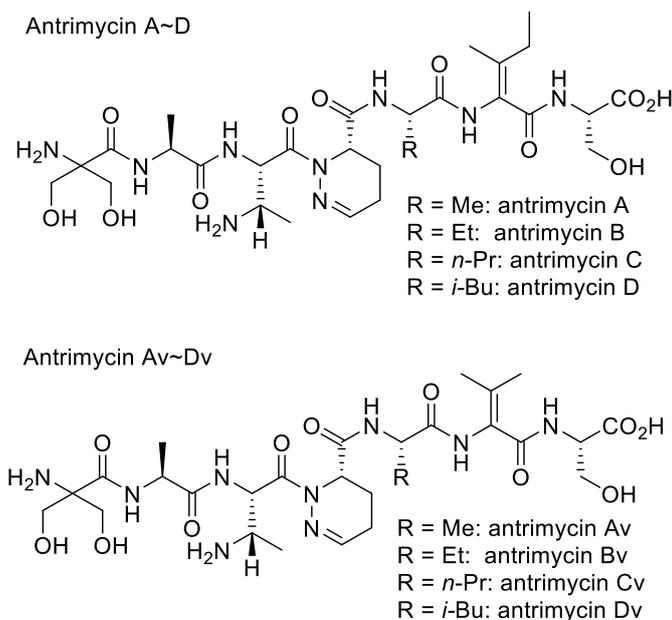
研究分野：天然物化学

キーワード：ペプチド 天然物 結核 標的分子

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核は深刻な肺炎を引き起こす感染症の一つである。年間 1000 万人が結核に感染し、160 万人もの命が奪われている (世界保健機構: Tuberculosis, factsheet 2023)。結核治療の有効な手段として抗生物質が用いられている。しかしながら、結核は抗生物質への抵抗力が強く、その根治が難しいことが知られている。有効な抗生物質は 10 種類程度と言われ、イソニアジド、リファンピシン、ピラジナミド、エタンブトール (またはストレプトマイシン) などを、複合的に長期間用いられている。これより一定の効果が得られている一方で、長期投与による肝機能障害、アレルギー、末梢神経障害などの副作用や、耐性菌が誘発されるなどの問題が生じている。こうした背景から、結核に対抗するための新たな薬剤開発が取り組むべき重要な社会的課題となっている。



アントリマイシン類は、抗結核菌活性を指標として梅沢らの研究グループと、大竹らの研究グループから、ほぼ同時期に単離報告されたペプチド系天然物である (Umezawa, H. et al. *J. Antibiot.* 1981, 34, 1613. Otake, N. et al. *Agric. Biol. Chem.* 1982, 46, 865)。本天然物は 7 つのアミノ酸から構成され、構成アミノ酸のうち 4 ないし 5 つが非天然型アミノ酸で構成されている。N 末から 2 番目のデヒドロアミノ酸 (2 種類) と 3 番目のアミノ酸 (4 種類) との組み合わせにより 8 つの立体異性体が存在する。アントリマイシン A~D はデヒドロイソロイシンを含みかつ置換基 (R) が異なる 4 種類であり、アントリマイシン Av~Dv はデヒドロバリンを含みかつ置換基 (R) が異なる 4 種類である。アントリマイシン A、D は核磁気共鳴スペクトルによって、アントリマイシン Av は全合成により構造が明らかにされた。それら以外については、質量分析およびアミノ酸分析により推定構造式が提出されている。

アントリマイシン類以外にも抗結核作用を示すペプチド系天然物はいくつか知られているが、アントリマイシン類は鎖状構造であることや、窒素原子に富む非天然型アミノ酸類を多く含み、かつ不飽和度と酸化段階が高いことを特徴としている。興味深い生物活性と他のペプチド系天然物とは一線を画す特異な化学構造から、これまでにアントリマイシン Av と Dv の全合成が行われているが、その他のアントリマイシン類の合成は未だ達成されていない。アントリマイシン類の抗結核活性は、主成分であるアントリマイシン A と D においてのみ報告されている。その他の天然同族体の生物活性は不明のままである。アントリマイシン類がなぜ抗結核作用を示すのかに関する作用機序もなされていない現状にあった。

2. 研究の目的

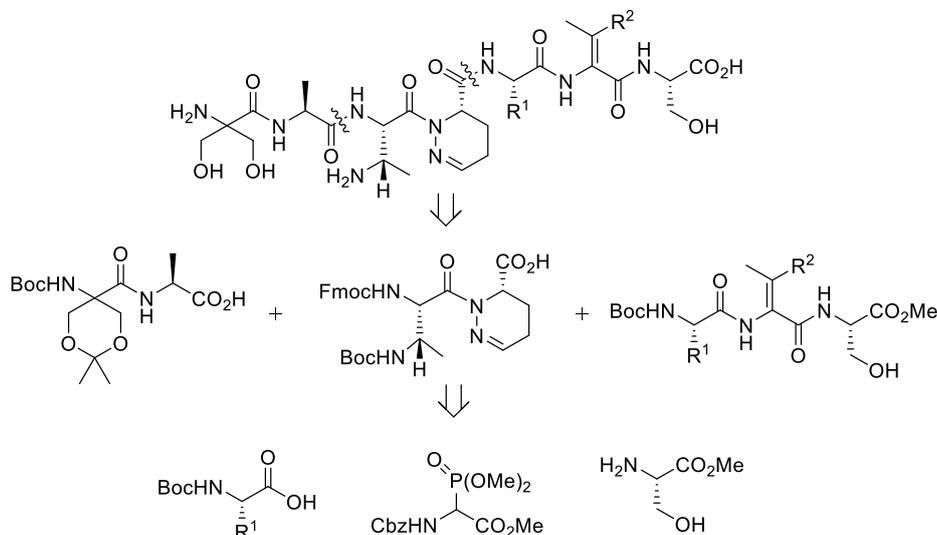
アントリマイシン類が特異な構造を有することに着目し、その標的分子はこれまで知られている抗菌剤の標的分子とは異なる新規なものに由来するのではないかと考えた。作業仮説が正しければ、新規標的分子をもとに有効な薬剤開発を行う分子戦略を提供することができる。本研究では、アントリマイシン類の標的分子の解明を目的として、下記に示す有機合成、活性評価、標的分子同定を総合的に行う、生物分子化学的な研究アプローチを立案した。

- (1) アントリマイシン類の網羅的全合成と抗菌活性評価
- (2) 合成中間体の抗菌活性評価
- (3) 標的分子の探索研究

3. 研究の方法

(1) アントリマイシン類の全合成と抗菌活性評価

天然物をジペプチドあるいはトリペプチドフラグメントに分割した。各フラグメントを3つの保護アミノ酸類から合成した。合成したペプチドフラグメントを順次縮合し、アントリマイシン類へと導いた。



合成化合物の抗菌活性は次の方法で評価した。バイオセーフティレベル (BSL) 2 の研究施設で取り扱いが可能であり、病原性を有する結核菌群と同じ遅生育型のワクチン株 *Mycobacterium bovis* BCG あるいは *Mycobacterium smegmatis* を検定菌として用いた。 *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur を Middlebrook 7H9 broth (BD, Franklin lakes, NJ, USA) containing 10% OADC (BD), 0.5% glycerol, and 0.05% Tween 80, or on Middlebrook 7H10 agar (BD) containing 10% OADC and 0.5% glycerol を培地として培養した。各化合物の最小発育阻害濃度 (MIC) は MTT 試薬を用いる比色定量法で行った (Abate, G. et al, *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 871–873.)。アントリマイシン類の DMSO 溶液 (200 μ M) とそれより段階的に 1/2 倍に希釈したサンプルを調製した。 *M. bovis* BCG (1 \times 10⁵ CFU/0.1 mL) を 96 穴プレートに分注し、サンプルを加えて 37 $^{\circ}$ C、7 日間インキュベーションしたのち MTT 試薬を加え吸光度を測定・解析した。

(2) 構造活性相関

アントリマイシン合成に用いた各フラグメントを脱保護したペプチド類について、上述の活性評価法により MIC を求めた。

(3) 標的分子の同定

ゲノム DNA ライブラリー形質転換株を用いた関連遺伝子の絞り込みと解析を試みた (M. Arai, et al., *ChemBioChem.* 2014, 15, 117-23)。ランダムに *M. bovis* BCG ゲノムを高発現する約 4000 株の *M. smegmatis* 形質転換株を調製し、アントリマイシン類に耐性を示す形質転換株をスクリーニングした。得られた耐性株についてゲノム配列を解析する。以下、ゲノム断片化、高発現株の作成、アントリマイシン類に対して感受性を示す株のスクリーニングサイクルを繰り返し、アントリマイシン類に耐性を付与する標的分子関連遺伝子を絞り込んだ。

4. 研究成果

(1) アントリマイシン類の全合成と抗菌活性

研究方法に従って、8 種類のアントリマイシン類すべてを全合成した (2024 年、日本化学会春季年会発表)。それらの抗菌活性を調べたところ、すべてのアントリマイシン類について、抗菌活性 (<50 μ g/mL) が認められた。アントリマイシン A, D 以外の 6 種の天然同族体の抗菌活性は本研究においてはじめて明らかにしたものである。これらの結果を踏まえて、現在、抗菌活性試験を *M. smegmatis* 以外の *Mycobacterium* 属細菌類に拡大して調査を進めている。

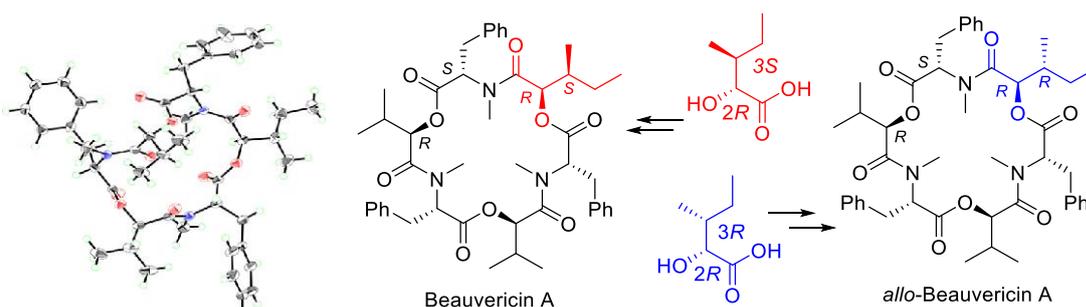
(2) 合成中間体の抗菌活性

アントリマイシンの合成中間体は、天然物に比べて弱い活性を示す、あるいは、ほとんど活性を示さないことがわかった。本結果は活性発現には 7 つのアミノ酸類が必要なことを示唆している。これらの結果は、アントリマイシンを基盤とするより有効な抗結核分子設計のための有効な指針となっている。これらを踏まえ、アナログ合成をさらに進めている。

(3) 標的分子の同定

ゲノム DNA ライブラリー形質転換株を用いた関連遺伝子の絞り込みを進めた結果、標的分子に関わる遺伝子、数種の絞り込みに成功した（未発表）。現在、最終的候補の絞り込みと解析を進めている。同時に、候補遺伝子から推測されるタンパク質の発現、機能解析が進展中である。全合成に端を発する研究から、標的を絞り込めたことは、標的分子に基づく抗菌化合物探索に向けた大きな一歩となった。本研究において、アントリマイシン類および合成中間体の抗結核菌活性を明らかにした。これらの知見は、より有効なアナログ設計に有効な指針を与えるものである。

ペプチドをベースとする抗結核天然物には、環状構造を有するものが多く知られている。構造と活性の相関と分子標的に関する知見を得るために、抗結核活性を示すことが報告されている環状デプシペプチド、Beauvericin 類を全合成し、それらの抗結核活性を調べた。その結果、beauvericin 類の絶対立体化学を結晶構造解析により確立するとともに、合成天然物が活性を示さないことを明らかにした（T. Shinada, M. Arai, et al., *ACS Omega* 2024, 9, 12228.）。現在、アントリマイシン類に関する研究成果と合わせて、より有効な抗結核薬開発に向けた研究が進行中である。



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 1件）

1. 著者名 Kurosawa Sumire, Okamura Hironori, Yoshida Ayako, Tomita Takeo, Sone Yusuke, Hasebe Fumihito, Shinada Tetsuro, Takikawa Hiroshiro, Kosono Saori, Nishiyama Makoto	4. 巻 18
2. 論文標題 Mechanisms of Sugar Aminotransferase-like Enzymes to Synthesize Stereoisomers of Non-proteinogenic Amino Acids in Natural Product Biosynthesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 385 ~ 395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.2c00823	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 Yasuno Yoko, Okamura Hironori, Shinada Tetsuro	4. 巻 80
2. 論文標題 Stereoselective Synthesis of Dehydroamino Acids and Its Application to the Synthesis of Nitrogen-containing Natural Products	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 331 ~ 342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.80.331	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 Kang Bubwoong, Shimizu Yuki, Tamura Yusaku, Fukuda Eigo, Hamamoto Ken-ichiro, Uchida Yuichiro, Yasuno Yoko, Nakayama Atsushi, Satoh Tetsuya, Kuse Masaki, Shinada Tetsuro	4. 巻 70
2. 論文標題 Formylation Reaction of Amines Using N-Formylcarbazole	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 492 ~ 497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00161	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 Yasuno Yoko, Yamaguchi Shunsuke, Karita Yuma, Sakai Kenta, Okamura Hironori, Nakayama Atsushi, Shinada Tetsuro	4. 巻 103
2. 論文標題 Stereoselective Synthesis of (2S,3R)- and (2S,3S)- 2-Amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-hydroxypropanoic Acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 965 ~ 965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-20-S(K)70	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 Okamura Hironori, Yasuno Yoko, Nakayama Atsushi, Kumadaki Katsushi, Kitsuwa Kohei, Ozawa Keita, Tamura Yusaku, Yamamoto Yuki, Shinada Tetsuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Selective oxidation of alcohol-d1 to aldehyde-d1 using MnO2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 28530 ~ 28534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA05405H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamura Hironori, Yasuno Yoko, Nakayama Atsushi, Takikawa Hirosato, Shinada Tetsuro	4. 巻 2021
2. 論文標題 Stereoselective Synthesis of (2S,6R) Diamino (5R,7) dihydroxy heptanoic Acid (DADH): An Unusual Amino Acid from Streptomyces sp. SANK 60404	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1396 ~ 1401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.202001646	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 Kang Bubwoong, Yasuno Yoko, Okamura Hironori, Sakai Asumi, Satoh Tetsuya, Kuse Masaki, Shinada Tetsuro	4. 巻 93
2. 論文標題 N-Acylcarbazole as a Selective Transamidation Reagent	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 993 ~ 999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200116	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 Shinada Tetsuro, Yasuno Yoko, Sawai Akira, Sekihara Ai	4. 巻 101
2. 論文標題 Synthesis of Optically Active (R)- and (S)- -Arginine from Pyroglutamic Acid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 165 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-19-S(F)6	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田村優作, 藤原維吹, 中山淳, 品田哲郎
2. 発表標題 アントリマイシン類の全合成
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田村優作, 中山淳, 品田哲郎
2. 発表標題 アントリマイシンAvの全合成
3. 学会等名 日本化学会 第102回春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡村 仁則, 保野 陽子, 中山淳, 品田哲郎, 滝川浩郷
2. 発表標題 非天然型アミノ酸DADHの全異性体の合成研究
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 姜法雄, 保野陽子, 岡村仁則, 酒井明日実, 佐藤哲也, 久世雅樹, 品田哲郎
2. 発表標題 N-アシルカルバゾールを用いた選択的アミド化反応の開発
3. 学会等名 第50回複素環化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 姜法雄、保野陽子、岡村仁則、酒井明日実、佐藤哲也、久世雅樹、品田哲郎
2. 発表標題 N-アシルカルバゾールを用いた選択的アミド化反応の開発
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 岡村仁則、滝川浩郷、品田哲郎
2. 発表標題 含アジリジン天然物の推定生合成中間体の合成研究
3. 学会等名 第64回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (TEAC)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪公立大学大学院理学研究科物質分子系専攻分子変換学研究室 http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/chem/henkan/index.html
--

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
研究分担者	保野 陽子 (Yoko Yasuno) (40736500)	九州大学・理学研究院・助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	荒井 雅吉 (Masayoshi Arai) (80311231)	大阪大学・大学院薬学研究科・教授 (14401)	

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