

## 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 4 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310134

研究課題名（和文） 昆虫が有する病原体認識システムを利用する天然物由来免疫制御物質の創生

研究課題名（英文） Development of Natural Product-Derived Innate Immune Regulators Using Insect Immune Systems

## 研究代表者

大島 吉輝（OSHIMA YOSHITERU）

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00111302

研究成果の概要（和文）：放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* から自然免疫抑制物質として新規トルコスタチン類縁体を単離し、*Streptomyces* sp. から転写・翻訳阻害作用を有する新規オウレリン酸類縁体を単離した。また、自然免疫活性化物質ゴニトリド A の立体構造を決定し、その同族体を単離した。加えて、合成したセラストラマイシン A、ゴニトリド A 誘導体の活性を検討し、セラストラマイシン A よりも強力な活性を有する誘導体、あるいは選択性が向上した誘導体を得た。

研究成果の概要（英文）：A new trichostatin analog and a new aurelic acid analog were isolated from *Streptomyces hygroscopicus* and *Streptomyces* sp. as an innate immune inhibitor inhibitory and a transcription/translation inhibitory compound, respectively. In addition, a stereostructure of gonytolide A, an innate immune activator, was determined, and its analogs were isolated from *Gonytrichum* sp. Structure-activity relationship study based on celastramycin A and gonytolide A was also carried out.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：天然物有機化学

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：微生物、自然免疫、天然物

## 1. 研究開始当初の背景

免疫には、一度感染した外敵の情報を記憶して次回の感染に備える獲得免疫と、細菌などの表層に存在する共通構造を認識して活性化される自然免疫がある。自然免疫は、微生物を認識し、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により微生物を排除する。1997年、ヒトTLR（Toll様受容体）が昆虫の免疫において重要な役割を果たすToll受容体のホモログとして発見され、哺乳類と昆虫は類似した自然免疫をもつことが明らかになった。さらに、精力的な研究によ

って、自然免疫異常は炎症、感染、アポトーシスなどの多岐にわたる疾患に関係することが明らかになっている。例えば、TNF- $\alpha$ 刺激によって活性化される NF- $\kappa$ B は免疫異常を含む疾患において大きな役割を果たしていることから、NF- $\kappa$ B 阻害剤は注目を集めている。これまで NF- $\kappa$ B を含むヒトの自然免疫経路に関与する幾つかの因子に対する個別の阻害剤研究はなされている。しかし、自然免疫経路には未だ解明されていない部分が残されており、さらに微生物の認識から遺伝子の発現に至る全体の経路に渡る制御物質の探索は行われていない。我々は、遺伝子組み換えショウジョウバエを用いて IMD 経路に対する活性を検出する独自のスクリーニングを確立した。さらに、本スクリーニングによって既に放線菌や糸状菌から自然免疫制御物質を単離し、制御物質はヒトの自然免疫をも制御することを明らかにしてきた。本研究の対象化合物である 2 種の活性化合物 (セラストラマイシン A (3) : 0.021  $\mu$ g/ml でショウジョウバエの自然免疫を抑制、新規化合物ゴニトリド A (7) : 10  $\mu$ g/ml でショウジョウバエの自然免疫を上昇) も本スクリーニングによって見出された。

## 2. 研究の目的

### (1) 微生物由来の自然免疫制御物質の探索

我々が構築した遺伝子組み換えショウジョウバエ幼虫を用いるスクリーニングによって、多種の天然資源から自然免疫制御物質を探る。単離された自然免疫制御物質については、創薬のリード化合物や生命科学試薬の創生に向けて哺乳類の自然免疫に対する活性を明らかにする。

### (2) 微生物由来の自然免疫制御物質を鍵物質とする医薬品化学研究

自然免疫抑制物質セラストラマイシン A (3) 誘導体を合成し、活性発現に必須な構造部分を明らかにする。

自然免疫活性化合物ゴニトリド A (7) の未確定の立体化学を決定するとともに、ゴニトリド A 生産菌から同族体を単離する。さらに、ゴニトリド A 誘導体を合成し、活性発現に必須な構造部分を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 微生物由来の自然免疫制御物質の探索

#### ①スクリーニング

我々が既に確立した、遺伝子組み換えショウジョウバエを用いる方法 (M. Yajima et al., *Biochem. J.*, 371, 205-210 (2003); M. Sekiya et al., *Life Sci.*, 80, 113-119 (2006)) によってスクリーニングを行った。

#### ②スクリーニングサンプル

(財) 微生物化学研究センターからサンプルの提供を受けた。

### ③単離された活性物質の構造解析

上記のスクリーニングによって単離された天然物の構造は機器分析データと誘導体調製等によって決定した。

### (2) 微生物由来の自然免疫制御物質を鍵物質とする医薬品化学研究

#### ①セラストラマイシン A

以下に示すセラストラマイシン A 誘導体を合成し、それらの自然免疫活性を測定した。

- ・セラストラマイシン A のピロール部位の変換：塩素原子に換わる他のハロゲン原子の導入、窒素原子上への種々のアルキル基の導入、ピロール環に換わる異種芳香環の導入
- ・ベンゼン環部位の変換：塩素原子に換わる他のハロゲン原子の導入、フェノール性水酸基の変換
- ・リンカー部位の変換：カルボニル基の還元、カルボニル基に換わるチオカルボニル基の導入、還元体のさらなる誘導化
- ・側鎖の変換：*n*-ヘキシル基に換わる種々のアルキル基の導入

#### ②ゴニトリド A

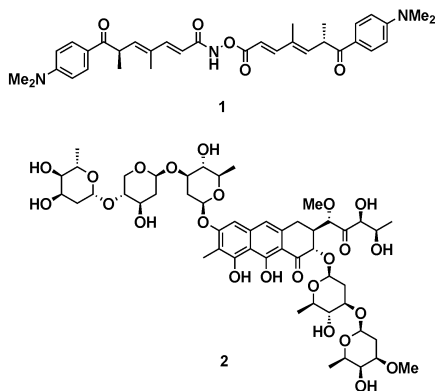
- ・ゴニトリド A (7) の立体構造の決定：化合物 7 の Br 置換体を合成し、その X 線結晶構造解析あるいは化合物 7 の還元体を經由したベンゾエート体を合成し、その CD によって絶対配置を決定した。
- ・ゴニトリド A 生産菌からの同族体の単離  
ゴニトリド A 生産菌が生産するゴニトリド A 類似成分を単離して構造を導いた。
- ・ゴニトリド A 誘導体の合成  
ゴニトリド A の合成を目指し、まずゴニトリド A を構成するクロマノン骨格をもつ様々な単量体を合成した。

## 4. 研究成果

### (1) 自然免疫制御物質の探索

放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* の *n*-BuOH 抽出物から、自然免疫抑制物質として新規化合物 1 を単離した。化合物 1 は *Att-luc* 系において強力な抑制作用 (IC<sub>50</sub> 0.0025  $\mu$ M) を示した。さらに詳細な検討に結果、化合物 1 の自然免疫応答抑制作用は、その分解によって生じたトリスタチン A の作用であることが示された。

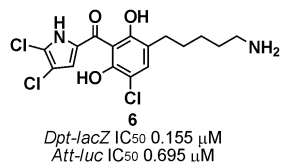
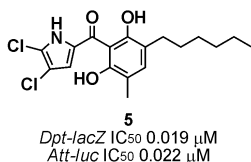
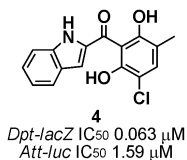
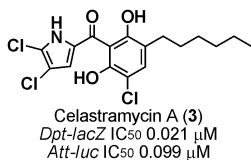
さらに、自然免疫制御物質のスクリーニング過程で、*Streptomyces* sp. の EtOH 抽出物から転写・翻訳阻害作用を有する新規物質 2 を単離した。化合物 2 は *hs-lacZ* 系アッセイにおいて強力な抑制作用 (IC<sub>50</sub> 0.036  $\mu$ M) を示した。化合物 2 の類縁体は DNA に結合することでポリメラーゼの機能を妨げ、転写や複製を阻害することが知られている。したがって、化合物 2 も同様の作用機序によるものであると推測される。



(2) 微生物由来の自然免疫制御物質を鍵物質とする医薬品化学研究

①セラストラマイシン A

セラストラマイシン A (3) を医薬品として用いるためには、自然免疫活性の増強、選択性の向上および水に対する溶解度の改善などの課題を克服しなければならない。そこで、確立した合成法を応用して 3 の誘導体合成を行い、構造活性相関を検討した。誘導体化はセラストラマイシン A (3) をピロール部位、ベンゼン部位およびアルキル鎖部位の 3 部位に分けて行い、各置換基の自然免疫活性への影響を確認した。そして、ピロール環をインドール環に変換した 4、ベンゼン環の塩素原子をメチル基に変換した 5、また、アルキル鎖末端にアミノ基を導入した 6 のような誘導体を 30 種以上合成したところ、5 はセラストラマイシン A (3) より約 5 倍強力な自然免疫抑制作用を示し、6 は活性が約 7 分の 1 に低下するものの、自然免疫活性と細胞毒性の選択性が 5 倍以上に向上することが判明した。



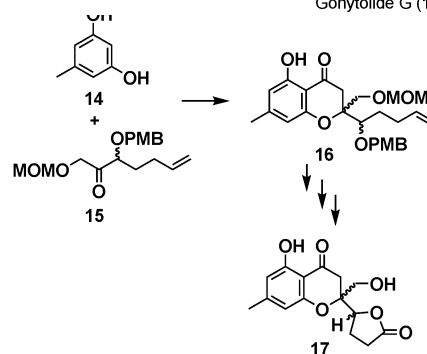
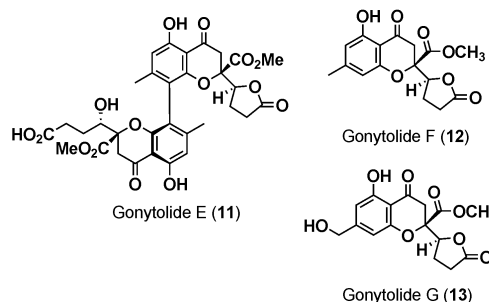
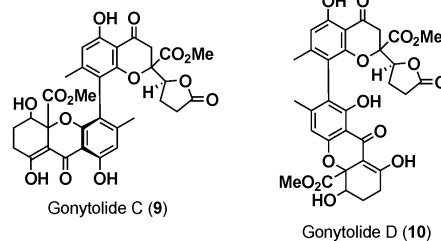
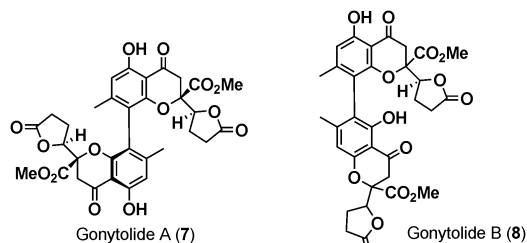
②ゴニトリド A

ゴニトリド A (7) の立体構造を決定した。すなわち、相対構造決定は NMR スペクトルデータおよび X 線結晶構造解析によって明らかにした。また、ゴニトリド A (7) の絶対構造は、その化学変換体を用いて決定した。

さらに、*Gonytrichum* sp. 抽出物に含まれる類縁体を網羅的に探索し、6 種の新規ゴニトリド A 類縁体 8-13 を単離した。これら

の化合物は自然免疫活性を示さなかった。

さらに、構造活性相関研究を目的としてゴニトリド A (7) の単量体に相当するゴニトリド F (12) の合成研究を行った。その結果、クロマンオン骨格および γ-ラクトン構造を有する 17 の合成に成功した。



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. Haruhisa Kikuchi, Masato Isobe, Shoichiro Kurata, Yasuhiro Katou and Yoshiteru Oshima, Structures of the Dimeric and Monomeric Chromanones, Gonytolides D – G, Isolated from the Fungus *Gonytrichum* sp., *Tetrahedron*, in press (2012). 査読有

2. Haruhisa Kikuchi, Kaori Okazaki, Mizuki Sekiya, Yasuyuki Uryu, Kazunori Ueda, Shoichiro Kurata, Yasuhiro Katou and Yoshiteru Oshima, Synthesis and Innate Immune Suppressive Effect of 1,2-Cyclopentanediol Derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, 46, 1263-1273 (2011). 査読有
  3. Mizuki Sekiya, Kazunori Ueda, Kaori Okazaki, Jun Terashima, Yasuhiro Katou, Haruhisa Kikuchi, Shoichiro Kurata and Yoshiteru Oshima, A Phytoceramide Analog Stimulates the Production of Chemokines Through CREB Activation in Human Endothelial Cells, *Int. Immunopharmacol.*, 11, 1497-1503 (2011). 査読有
  4. Haruhisa Kikuchi, Masato Isobe, Mizuki Sekiya, Yuko Abe, Tsuyoshi Hoshikawa, Kazunori Ueda, Shoichiro Kurata, Yasuhiro Katou and Yoshiteru Oshima, 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.*, 13, 4624-4627 (2011). 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
1. 星川毅、菊地晴久、阿部由布子、倉田祥一朗、加藤泰弘、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、札幌
  2. 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、東京
  3. 星川毅、菊地晴久、阿部由布子、倉田祥一朗、加藤泰弘、大島吉輝、自然免疫増強作用を有する gonytolide A 誘導体の開発、第50回記念日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台
  4. 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、仙台
  5. 大島吉輝、昆虫を利用する天然物化学研究、日本薬学会第131年会(特別シンポジウム:天然物化学とケミカルバイオロジー)、2011年3月30日、静岡
  6. 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、天然資源由来の自然免疫応答制御物質の探索、日本薬学会第131年会、2011年3月31日、静岡
  7. 加藤泰弘、関谷瑞樹、壁谷尚宏、上田和則、菊地晴久、倉田祥一朗、大島吉輝、放線菌由来化合物 celastramycin A のTNF経路に対する作用、日本薬学会第131年会、2011年3月31日、静岡
  8. 阿部由布子、加藤泰弘、磯辺真人、関谷瑞樹、上田和則、菊地晴久、倉田祥一朗、大島吉輝、糸状菌由来化合物 gonytolide A のヒト TNF 経路における作用の解析、日本薬学会第131年会、2011年3月31日、静岡
  9. 壁谷尚宏、菊地晴久、加藤泰弘、関谷瑞樹、上田和則、倉田祥一朗、大島吉輝、放線菌由来 celastramycin A を基盤とした自然免疫抑制剤の創製、第29回メディシナルケミストリーシンポジウム、2010年11月19日、京都
  10. 壁谷尚宏、菊地晴久、加藤泰弘、関谷瑞樹、上田和則、倉田祥一朗、大島吉輝、放線菌由来 celastramycin A を基盤とした自然免疫抑制剤の創製、創薬懇話会 2010、2010年11月12日、蔵王
  11. Yoshiteru Oshima、Natural Products Regulating Innate Immunity、International Seminar & Expo on Jamu、2010年11月5日、バンドン(インドネシア)
  12. 阿部由布子、加藤泰弘、関谷瑞樹、磯辺真人、上田和則、菊地晴久、倉田祥一朗、大島吉輝、ショウジョウバエ自然免疫賦活化作用を有する gonytolide A の TNF 経路に対する作用、第49回日本薬学会東北支部大会、2010年10月24日、郡山
  13. 菊地晴久、自然界からの感染症治療薬、第9回東北国際保健研究会、2010年5月30日、仙台
  14. 菊地晴久、壁谷尚宏、関谷瑞樹、上田和則、加藤泰弘、倉田祥一朗、大島吉輝、自然免疫応答抑制作用を有する celastramycin A の構造活性相関、日本薬学会第130年会、2010年3月29日、岡山
  15. 菊地晴久、中村哲也、加藤泰弘、上田和則、関谷瑞樹、倉田祥一朗、大島吉輝、天然資源からの自然免疫制御物質の探索、日本薬学会第130年会、2010年3月29日、岡山

16. Yoshiteru Oshima、Natural Products Regulating Innate Immunity、The 7th International Symposium for Chinese Medicinal Chemists、2010年2月2日、高雄
17. Yoshiteru Oshima、Natural Products Regulating Innate Immunity、International Symposium on AIDS and Tuberculosis、2010年1月13日、仙台
18. 菊地晴久、壁谷尚宏、関谷瑞樹、上田和則、加藤泰弘、倉田祥一郎、大島吉輝、自然免疫応答抑制作用を有する celastramycin A の合成および構造活性相関、創薬懇話会 2009、2009年12月10日、岐阜
19. 菊地晴久、壁谷尚宏、関谷瑞樹、上田和則、加藤泰弘、倉田祥一郎、大島吉輝、自然免疫応答抑制作用を有する celastramycin A の合成および構造活性相関、第48回日本薬学会東北支部大会、2009年10月18日、仙台
20. 菊地晴久、関谷瑞樹、磯辺真人、壁谷尚宏、中村哲也、上田和則、加藤泰弘、倉田祥一郎、大島吉輝、天然資源からの自然免疫制御物質の探索、第51回天然有機化合物討論会、2009年10月8日、名古屋

[産業財産権]

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~shigen/lab/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大島 吉輝 (OSHIMA YOSHITERU)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：00111302

### (2) 研究分担者

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

加藤 康弘 (KATOU YASUHIRO)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：50455797