

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850074

研究課題名(和文) ナノクラスター化による天然物由来高活性新規抗菌剤の開発研究

研究課題名(英文) Synthetic study of novel antibiotics derived from natural products using cluster effect

研究代表者

榎本 賢 (ENOMOTO, Masaru)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90546342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：分子の多量化とそれに伴う多点結合の形成により結合力が増強される効果を「クラスター効果」と呼ぶ。本効果を利用して、抗真菌抗HIV活性天然物pradimicinを金ナノ粒子上に担持したPRM-AuNPsを作製して、マンノースに対する結合力と抗真菌活性を評価した。その結果、抗真菌活性はpradimicinより劣るものの、結合力が約10倍向上していることを見出した。また、PRMの活性発現機構と金ナノ粒子の特徴に着目することで、PRM-AuNPsがマンノース残基を検出可能なケモセンサーとして機能することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Multivalent interaction that enhances affinity between proteins and ligands is called a cluster effect. We evaluated the binding affinity and antifungal activity of PRM-AuNPs, which was synthesized by functionalizing gold nanoparticles (AuNPs) with pradimicin (PRM), antifungal and anti-HIV natural product. Consequently, the binding affinity of PRM-AuNPs to mannose (Man) was found to increase ten times as strong as the case of PRM although the antifungal activity of PRM-AuNPs was slightly decreased. Moreover, by making use of the distance-dependent optical properties of AuNPs as well as the Man-specific binding ability of PRM, we have developed a chemosensor that was capable of recognizing mannose residues in oligosaccharides.

研究分野：天然物化学

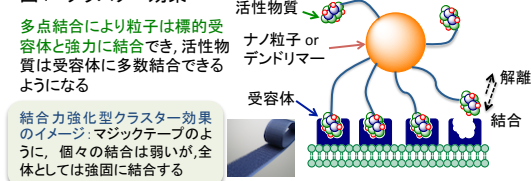
キーワード：クラスター効果 天然物 金ナノ粒子 抗菌物質 ケモセンサー

## 1. 研究開始当初の背景

昨今の病原性大腸菌の流行により、抗菌製品が一般的になるにつれて抗菌剤の需要は高まるばかりであるが、その一方で薬剤耐性菌の出現が問題になり新規抗菌剤の開発が急務となっている。近年の薬剤開発は合成化合物ライブラリーからのスクリーニングが主流となりつつあったが、そこから得られる化合物の構造多様性は天然物よりも乏しいことが明らかにされている。これにより、新たな薬理活性が見出される化合物も頭打ちになっていると言われる。それを解決するため構造多様性に優れた天然物の利用が見直されている。しかしながら、天然物を医薬品に使うには物性や分子量が問題となる場合が多く、化学的な構造改変が求められる。また、天然物の中には有用な生物活性の種類や発現機構を示すにも関わらず、活性の強度が弱いために実用化が難しい化合物もある。申請者は、天然物を抗菌剤として利用する際の問題点がナノテクノロジーと天然物化学の融合により解決できると考えて本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

図1 クラスタ効果



分子の多量化により結合力が増強される現象を「クラスタ効果」と言う。これは、分子の多量化により結合力が強化される効果のことで、担体に結合した分子が多点結合することでエントロピー的に結合が有利になる。生体内ではこれと同様の効果が知られており、例えば、細胞表面の脂質ラフト構造では糖鎖が集合化することでタンパク質との親和力を高めている。糖鎖-タンパク質間の一つ一つの水素結合は決して強くないが、多点で水素結合することで全体としての結合力を向上させている。これについての日常生活に関する例を挙げれば、マジックテープが近いと言えるだろう。このようにクラスタ効果は有用物質を開発するにあたって非常に有用な効果と言える。しかしながら、本効果はこれまで糖鎖や核酸等の生体高分子化合物を題材にして利用された例は多いものの、意外にも二次代謝天然物を題材にして利用された例はほとんど報告されていない。そこで、本研究では、優れた特徴を有するにも関わらず結合力の強さが問題となって実用化に至らない二次代謝天然物を題材にしてその結合力を増強し、新規抗菌剤を開発することを目的として研究を行った。

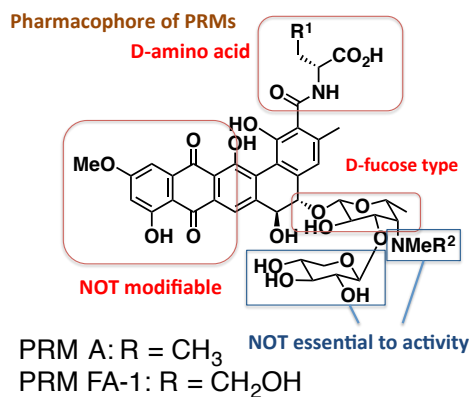
## 3. 研究の方法

当初、本研究の題材に用いる天然物として

イオノフォア抗菌物質ポリナクチンを想定していたが、研究協力者からクラスタ効果による活性の増強がより一層期待できる抗真菌・抗 HIV 活性天然物 pradimicin (PRM) の提供を得られたので、PRM のクラスタ化を優先して研究を進めることにした。PRM は、細胞膜浸透圧調節部位のマンノース残基に結合するという特異な作用機構により抗菌活性 (MIC 6  $\mu\text{g/ml}$ ) を示し、放線菌培養液から大量に得られる (300 mg/L) ことから実用的抗菌剤として有望な化合物であるが、市販されている抗菌剤と比較すると 10-100 倍程度の活性向上が望まれる。これは結合力の弱さに起因すると考えられるが、PRM の溶解性の乏しさも問題であった。受領者はこれらの問題が金ナノ粒子上に PRM を担持することにより解決できるのではないかと考えた。即ち、クラスタ効果により結合力を強化するとともに、担持の際に使用するリンカーにより物性もコントロールできると期待した。

PRM の構造活性相関を図2に示した。PRM の構造のうち、芳香環部位とアミノ酸部位を修飾すると活性が失われることが研究協力者の五十嵐ら (富山県立大学工学部) により明らかにされている。フコサミンのアミノ基とキシロース部位は修飾可能であるが、選択的な反応が可能でアミノ基を足がかりに修飾を行うことにした。

図2 Pradimicin (PRM) の構造式と構造活性相関

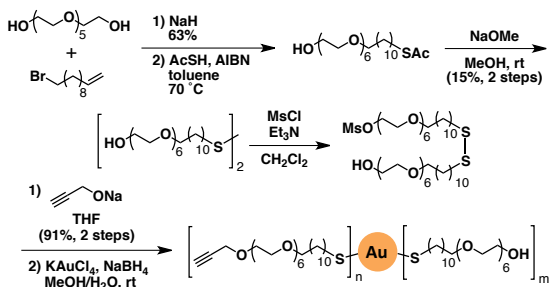


## 4. 研究成果

### (1) PRM 担持金ナノ粒子 (PRM-AuNPs) の調製

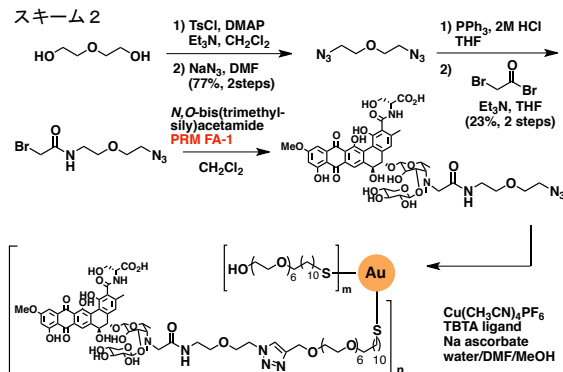
まず、スキーム1に示した方法によりリンカーを担持した金ナノ粒子の合成を行った。Hexaethylene glycol と 11-bromo-1-undecene から2工程でチオールエステルへと導き、加水分解とそれに伴う二量化によりジスルフィドとした。最終物の水溶性を担保するために、この化合物の一方のヒドロキシ基のみをメシル化した後に、プロパルジールアルコールのナトリウム塩で処理してアルキン部位を導入した。この化合物を塩化金(III)酸カリウム共存化、水素化ホウ素ナトリウムで処理して、アルキン部位をリンカーに備えた金ナノ粒子の調製を完了した。

スキーム 1



続いて PRM 側の修飾を行った (スキーム 2)。Ethylene glycol から 2 工程でジアジドへと導き、さらに 2 工程で一方のアジ基をプロモアセトアミドへと変換した。この化合物を *N,O*-bistrimethylsilylacetamide 存在化で PRM FA-1 と反応させて、アジ基を持つ PRM FA-1 誘導体へと変換し、スキーム 1 で調製した金ナノ粒子と Huisgen 反応により連結して目的の金ナノ粒子を調製した。

スキーム 2



## (2) PRM-AuNPs の物性評価

粒径の確認は動的光散乱法で行い、リンカーも含めた粒径がおおよそ 15 nm であると決定した。この結果と一般的な C-C および C-O 結合長からコア部位の金ナノ粒子の半径を求めると約 2.8 nm となる。文献 (*Langmuir* **1998**, *14*, 17–30) によるとこのサイズの金ナノ粒子に結合するアルキルチオールリンカーの数は 600 と報告されている。リンカーのうち半数が末端にアルキンを持つので、1つの金ナノ粒子上に担持された PRM 数は最大で 300 と計算された。

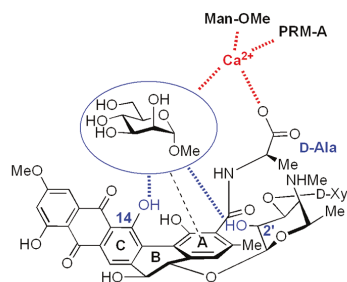
続いて、PRM 担持金ナノ粒子の解離定数 (*K<sub>d</sub>*) をマンノース滴下実験における紫外可視吸光スペクトルのシフトより算出したところ 10  $\mu$ M であった。PRM そのものの解離定数 96  $\mu$ M と比較して約 10 分の 1 となったことから結合力の増強が確認された。

## (3) PRM-AuNPs の抗菌活性試験

PRM-AuNPs の抗菌活性試験を実施した (未発表データ)。カビ (Strains A および B) または酵母 (Strains C および D) を含む培地に PRM 担持金ナノ粒子 (PRM-AuNPs) を 0, 12.5, 25 および 50  $\mu$ g/ml の濃度になるように加えて試験したところ、A および D に対して PRM-AuNPs は抗菌活性を示したものの、期待に反して PRM そのものと比較して 4 分の

1 程度の抗菌活性しか示さなかった (B については測定した濃度範囲内では PRM 担持金ナノ粒子は抗菌活性を示さず、C についてはポジティブコントロールの PRM そのものにおいても 0  $\mu$ g/ml で生育しなかった)ので正確なデータは取れていない)。しかしながら、クラスター化した PRM 担持金ナノ粒子においても抗菌活性を示したことは大きな知見と考えている。結合力が約 10 倍になったにも関わらず、結果的に抗菌活性は 4 分の 1 程度だった原因として、凝集性とそれに伴う粒径の増大を考えている。PRM そのものも金ナノ粒子も凝集性があり、実際に高濃度になると容器壁面の粒子が付着し、完全に乾固すると溶媒を加えても溶解しなくなる。培地に添加する際に 50  $\mu$ g/ml の PRM-AuNPs 溶液を調製したが、その際に凝集に伴う粒径の増大が起こり、菌の細胞壁を透過しにくくなっている可能性が示唆された。今後は、金ナノ粒子と比較して凝集性の低いデンドリマーを利用してクラスター化を行うことを計画している。

図 3

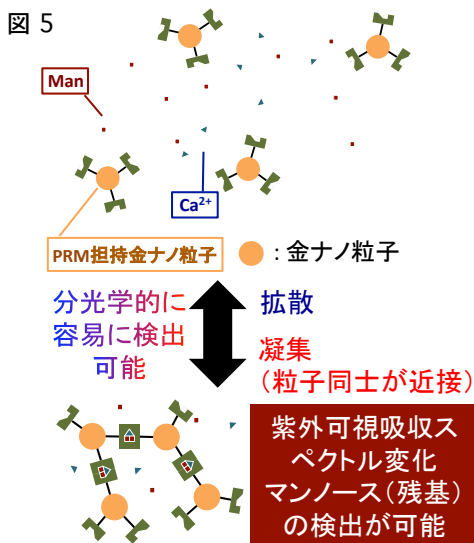
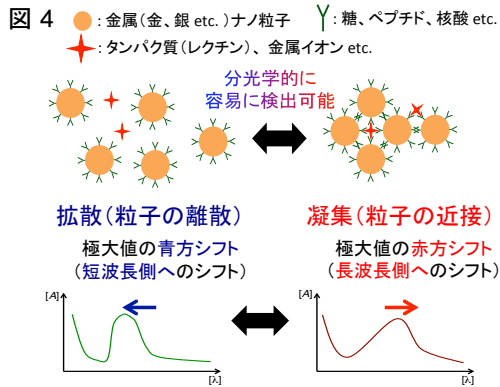


Y. Nakagawa et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17485.

## (4) PRM-AuNPs のケモセンサーとしての利用

PRM は、浸透圧を調節する糖タンパク質 Sln1 に結合することで機能を破壊し抗菌活性を示すことが知られている。また PRM は抗 HIV 活性も示し、HIV ウイルス表面の gp120 という糖タンパク質に結合することでその感染過程を阻害し活性を発現する。PRM はこれら糖タンパク質に結合する際、マンノース残基を特異的に認識して結合すると考えられている。通常、糖鎖はレクチン (タンパク質) により認識されるが、PRM は低分子化合物であるにも関わらず、マンノース残基の認識が可能であり、天然化学・有機化学の観点からも多くの化学者の注目を集めている。その認識機構は中川ら (名古屋大学農学部) により精力的に研究されており、図 3 (*J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17485–17493.) に示した様に PRM (図中では PRM A) がカルシウムイオンを介してマンノース 2 分子と結合するモデルが提唱されている。

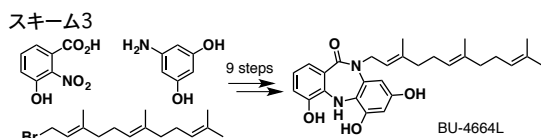
一方、金ナノ粒子は図 4 に示すように粒子同士が近接すると紫外可視吸収スペクトルが変化することが知られている。PRM のマンノース認識機構を考慮すると PRM-AuNPs は、マンノース残基が存在すれば表面に担持さ



れた PRM の凝集に伴って金ナノ粒子どうしが近接することになるので、紫外可視吸収スペクトルが変化することになる(図5)。つまり、PRM-AuNPs を使えば糖タンパク質中のマンノース残基の検出が可能になると考えた。

この着想に基づき研究を実施したところ、PRM-AuNPs はマンノース残基を特異的に検出することが可能であった。さらに、PRM そのものは非還元末端のマンノース残基と 1,6-二置換マンノース残基しか結合できないと考えられてきたが、PRM-AuNPs はこれ以外の置換様式を持つマンノース残基にも結合可能であることが示唆された。また、二次代謝天然物がケモセンサーに利用された例はこれまでに知られておらず、ナノテクノロジーと融合することで二次代謝天然物の新たな利用法を示すことができたと考えている。本研究成果は *Tetrahedron* に投稿し受理された。

#### (5) BU-4664L の合成



また、新たなクラスター化対象化合物とし

てがん細胞浸潤阻害物質 BU4664-L の全合成も達成した。本研究成果は *Tetrahedron Lett.* にて発表した。

#### 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3件)

- ① Masaru Enomoto, Yasuhiro Igarashi, Masahide Sasaki and Hiroki Shimizu, “A mannose-recognizable chemosensor using gold nanoparticles functionalized with pradimicin, a nonpeptidic mannose-binding natural product” *Tetrahedron* (査読有), 71, 2603–2609 (2015).
- ② Yusuke Takahashi, Takafumi Hirokawa, Mai Watanabe, Satomi Fujita, Yusuke Ogura, Masaru Enomoto and Shigefumi Kuwahara, “First synthesis of BU-4664L”, *Tetrahedron Letters* (査読有), 56, 5670–5672 (2015).
- ③ 榎本賢, 『クラスター効果を利用した創薬研究』 *有機合成化学協会誌* (査読有), 68, 388–389 (2015).

[学会発表] (計5件)

- ① Masaru Enomoto, Yasuhiro Igarashi, Masahide Sasaki and Hiroki Shimizu, “Mannose-recognizable chemosensor using gold nanoparticles functionalized with pradimicin, a nonpeptidic mannose-binding natural product”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem) 2015, #392, poster, 12/15–20, 2015, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii (USA).
- ② 榎本賢, 五十嵐康弘, 佐々木正秀, 清水弘樹, 「Mannose recognition using pradimicin-functionalized gold nanoparticles」平成27年度化学系学協会東北大会, 2p051, ポスター, 2015年9月12–13日, 弘前大学文京キャンパス(青森県弘前市).
- ③ 榎本賢, 五十嵐康弘, 佐々木正秀, 清水弘樹, 「天然有機化合物 pradimicin を利用したマンノース認識金ナノ粒子の創成」日本農芸化学会2015年度大会,

2E21p09, 口頭, 2015年3月, 岡山大学農学部(岡山県岡山市)。

- ④ 榎本賢, 「天然有機化合物の全合成とナノクラスター化による天然物利用研究」, 第189回農芸化学特別セミナー(招待講演), 口頭, 2014年11月28日, 岡山大学農学部(岡山県岡山市)。
- ⑤ 榎本賢, 五十嵐康弘, 佐々木正秀, 清水弘樹, 「天然有機化合物 pradimicin を利用したマンノース認識金ナノ粒子の創成」日本農芸化学会北海道・東北支部合同支部会, A01, 口頭, 2014年9月22-23日, 北海道大学農学部(北海道札幌市)。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-bima/>  
(国立研究開発法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門生物材料工学研究グループ)

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/yuuki/seibutsuyuki/index.html> (東北大学大学院農学研究科生物有機化学分野)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎本 賢 (ENOMOTO, Masaru)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 90546342

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし